

# **Funktionelle Charakterisierung der Interaktion des COP9-Signalosoms mit dem Mikrotubuli-bindenden Protein EB1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von  
Andreas Peth

geboren am 25.06.1978 in Idar-Oberstein

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel  
2. Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter  
3. Prof. Dr. Gerhard Braus

eingereicht: 23.04.2007

Datum der Promotion: 24.09.2007

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	6
1. Einleitung .....	7
1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	7
1.1.1. Ub und Ub-Ligasen .....	7
1.1.2. Das Proteasom .....	10
1.2. Das COP9-Signalosom .....	12
1.2.1. Aufbau des COP9-Signalosoms (CSN).....	12
1.2.2. Interaktionspartner und Aktivitäten des CSN .....	14
1.2.3. Regulation von CRLs durch das CSN .....	16
1.2.4. Knockout- und Knockdown-Studien des CSN .....	17
1.3. Mikrotubuli.....	19
1.3.1. Aufbau von Mikrotubuli.....	19
1.3.2. Funktion von Mikrotubuli .....	20
1.3.3. Das EB1-Protein .....	22
1.3.3.1. Die Rolle des EB1 bei der Polymerisierung der Mikrotubuli .....	24
1.3.3.2. Die Rolle von EB1 im Zellzyklus.....	25
1.4. Zielstellung der Arbeit .....	27
2. Material und Methoden .....	28
2.1.1. Materialien .....	28
2.1.2. Geräte .....	28
2.1.3. Chemikalien .....	28
2.1.4. Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.5. Puffer und Lösungen.....	30
2.1.6. Enzyme und Kits .....	31
2.1.7. Antikörper.....	31
2.1.8. Oligonukleotide .....	32
2.1.9. Vektoren.....	33
2.1.10. Medien .....	33
2.1.11. <i>Escherichia coli</i> Stämme .....	33
2.1.12. Eukaryotische Zelllinien .....	34
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.2. Ortsspezifische Mutagenese .....	35
2.2.3. Agarosegelelektrophorese .....	35
2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	35
2.2.5. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
2.2.7. Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	36
2.2.7.1. Herstellung von chemokompetenten Bakterien.....	36
2.2.7.2. Herstellung von elektrokompetenten Bakterien.....	36
2.2.7.3. Transformation durch Hitzeschock.....	36
2.2.7.4. Transformation durch Elektroporation .....	37
2.2.8. Plasmidpräparation .....	37
2.2.8.1. Plasmidpräparation mit Phenol/Chloroform.....	37
2.2.8.2. Mini-Präp mittels Alkalischer Lyse.....	37
2.2.8.3. Maxi-Präp.....	37
2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	38
2.3.1. Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	38
2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38

2.3.3.	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE).....	39
2.3.4.	Coomassie-Färbung.....	39
2.3.5.	Western-Blot und Immunodetektion.....	39
2.3.6.	Ponceau S-Färbung.....	40
2.3.7.	TCA-Fällung.....	40
2.3.8.	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien.....	40
2.3.8.1.	GST-Pulldown.....	40
2.3.8.2.	Ni-NTA-Pulldown.....	40
2.3.9.	<i>In vitro</i> -Kinaseassay.....	41
2.3.10.	<i>In vitro</i> -Degradationsassay.....	41
2.3.11.	Präparation des CSN.....	41
2.3.11.1.	Lyse der Erythrozyten.....	41
2.3.11.2.	DEAE-Ionenaustauscher.....	41
2.3.11.3.	Ammoniumsulfatfällung.....	42
2.3.11.4.	Dichtegradientenzentrifugation I.....	42
2.3.11.5.	FPLC: MonoQ-Säule.....	42
2.3.11.6.	Dichtegradientenzentrifugation II.....	43
2.4.	Zellkultur.....	43
2.4.1.	Kultivierung.....	43
2.4.2.	Lyse von HeLa-Zellen.....	43
2.4.3.	Cycloheximid-Versuche.....	43
2.4.4.	Transiente Transfektion.....	44
2.4.5.	Stabile Transfektion.....	44
2.4.6.	<i>In vivo</i> -Phosphomarkierung.....	44
2.4.7.	Nocodazol-Behandlung.....	44
2.4.8.	FACS-Analyse.....	45
2.4.9.	Immunofluoreszenzmikroskopie.....	45
2.4.10.	Glycerolgradient von Zelllysaten.....	46
2.4.11.	Flag-Pulldown.....	46
2.4.12.	Ni-NTA-Pulldown aus Zelllysaten.....	46
2.4.13.	Immunopräzipitation.....	46
2.4.14.	siRNA-Versuche.....	47
3.	Ergebnisse.....	48
3.1.	siRNA-Studien von COP9-Signalosom-Untereinheiten.....	48
3.1.1.	Charakterisierung der siRNA-Zelllinien.....	48
3.1.2.	Effekte der CSN-siRNA auf die Stabilität von Komponenten der CRLs.....	53
3.1.3.	Effekte der CSN-siRNA auf Abbau und Phosphorylierung von c-Jun.....	55
3.2.	Interaktion von EB1 mit dem CSN.....	58
3.2.1.	Ko-Purifizierung von EB1 mit dem CSN.....	58
3.2.2.	Interaktion von EB1 mit dem CSN in HeLa-Zellen.....	59
3.2.3.	Direkte Bindung von EB1 an das CSN.....	62
3.2.4.	Bindung von EB1 über CSN5 an das CSN.....	62
3.2.5.	Bindung von EB1 über dessen C-Terminus an das CSN.....	65
3.2.6.	EB1 bindet als Dimer an das CSN.....	66
3.2.7.	Beschleunigter Abbau von EB1 in CSN-siRNA-Zelllinien.....	67
3.2.8.	Ubiquitin-abhängiger Abbau von EB1.....	69
3.2.9.	Beschleunigung des Abbaus von EB1 durch USP15.....	70
3.2.10.	Stabilisierung von EB1 durch Phosphorylierung durch das CSN.....	72
3.3.	Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten durch EB1 und das CSN.....	74
4.	Diskussion.....	78
4.1.	siRNA-Studien mit Untereinheiten des CSN-Komplexes.....	78

4.1.1.	Knockdown von CSN1 und CSN3 .....	78
4.1.2.	Besonderheiten des CSN5-Knockdowns .....	79
4.1.3.	Pleiotrope Effekte durch Knockdown und Knockout des CSN .....	80
4.1.3.1.	Effekte der CSN-siRNA auf CRLs .....	81
4.1.3.2.	Effekte der CSN-siRNA auf die Phosphorylierung von Substraten .....	82
4.1.3.3.	CSN-siRNA-Studien zum Abbau von c-Jun .....	83
4.2.	Das CSN kontrolliert die Stabilität von EB1 .....	84
4.2.1.	Interaktion von EB1 mit dem CSN .....	84
4.2.2.	Die CSN5-vermittelte Bindung an das CSN stabilisiert EB1 .....	84
4.2.3.	Phosphorylierung von EB1 durch das CSN .....	87
4.2.4.	Lokalisation der Interaktion von EB1 mit dem CSN in Zellen .....	88
4.3.	Effekte der CSN-siRNA auf Mikrotubulifilamente .....	89
4.4.	Ausblick .....	92
5.	Literaturverzeichnis .....	94
6.	Anhang .....	105
	Abkürzungsverzeichnis .....	105
	Publikationsliste .....	107
	Lebenslauf .....	108
	Danksagung .....	109
	Erklärung .....	110

## Zusammenfassung

Das COP9-Signalosom (CSN) ist ein evolutionär konservierter Proteinkomplex. Er besteht aus acht Untereinheiten und wird als Paralog des Lid-Subkomplexes des 26S Proteasoms angesehen. Das CSN verfügt über diverse enzymatische Aktivitäten, die es zu einem regulatorischen Faktor des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) machen. Das UPS ist für den Abbau von einem Großteil der zellulären Proteine notwendig. Für die Proteolyse bestimmter Proteine werden diese mit einer Polyubiquitinkette markiert. Dies geschieht über eine Enzymkaskade von E1, E2s und E3-Ligasen, wobei die E3s die Substratspezifität bestimmen. Die Interaktion von E3s mit dem CSN ist für deren Assemblierung und Aktivität von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren bindet das CSN eine Vielzahl von proteasomalen Substraten und scheint deren Abbau direkt zu kontrollieren.

In dieser Arbeit konnte eine Interaktion des CSN mit dem Mikrotubuli-bindenden Protein EB1 nachgewiesen werden. EB1 wirkt präferentiell an den (+)-Enden von Mikrotubuli und fördert die Polymerisierung und Stabilität von Mikrotubulifilamenten. EB1 bindet über die Untereinheit CSN5 an das CSN. Die Interaktion von EB1 mit dem CSN findet im Centrosom statt und führt zur Phosphorylierung und Stabilisierung von EB1. Eine verminderte Bindung von EB1 an das CSN oder eine reduzierte Phosphorylierung von EB1 führt zu einem beschleunigten Abbau.

Die Funktion der Interaktion zwischen EB1 und dem CSN wurde in CSN-siRNA-Zelllinien untersucht. Dazu wurden die Untereinheiten CSN1, 3 und 5 in HeLa-Zellen permanent herunterreguliert. Die siRNAs gegen CSN1 und 3 (siCSN1, siCSN3) führen zur Reduktion des gesamten CSN Komplexes, der Knockdown von CSN5 (siCSN5) nur zur Verminderung von CSN5. In allen drei Zelllinien ist der Abbau von EB1 beschleunigt, was auf eine verminderte Bindung an, bzw. Phosphorylierung durch das CSN zurückzuführen ist.

Dies hat Konsequenzen für die Stabilität von Mikrotubulifilamenten in siCSN1- und siCSN3-Zellen. Diese zeigen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Nocodazol, welches die Polymerisierung von Mikrotubuli inhibiert. Des Weiteren konnte ein durch Nocodazol ausgelöster Zellzyklusarrest durch die Überexpression von EB1 oder CSN1 in HeLa-Zellen überwunden werden.

**Abstract**

The COP9 signalosome (CSN) is an evolutionary conserved protein complex. It consists out of eight subunits and is a paralogue to the lid subcomplex of the 26S proteasome. The CSN possesses several activities, supporting its function as a regulator of the Ubiquitin Proteasome System (UPS). The UPS mediates the degradation of the majority of the cellular proteins. Prior to degradation, a poly-ubiquitin chain is attached to the proteins. This process is catalyzed by a cascade of E1, E2s and E3-ligases. The CSN is a regulator of the E3-ligases, which determine substrate selectivity of the ubiquitination. The CSN also directly binds and thereby controls degradation of several proteasomal substrates.

In the present study a direct interaction between the CSN and the microtubule binding protein EB1 is shown, which is mediated by the subunit CSN5. EB1 binds preferentially to the (+)-ends of microtubules and thereby promotes polymerisation rates and enhances the stability of microtubule filaments. The interaction between the CSN and EB1 is localized to the centrosome and results in EB1 phosphorylation and stabilization. A compromised binding of EB1 to the CSN results in an accelerated degradation.

For functional studies of the CSN-EB1 interaction in HeLa cells, siRNA mediated knockdowns of CSN subunits were used. The subunits CSN1, CSN3 and CSN5 were knocked down permanently resulting in a faster proteolysis of EB1. This was a result of decreased amounts of CSN complex in cells with downregulated CSN1 and CSN3. The knockdown of CSN5 affects only subunit CSN5 levels causing a compromised binding of EB1 to the CSN complex.

An increased sensitivity to the microtubule disrupting agent nocodazole was observed in the CSN1 and CSN3 knockdown cells. A cell cycle arrest induced in HeLa cells by nocodazole treatment was rescued by overexpression of EB1 or CSN1. The data presented in this study suggest a functional relationship of EB1 and the CSN resulting in a stabilization of microtubule filaments.

**Keywords:** COP9 Signalosome, EB1, siRNA, microtubules

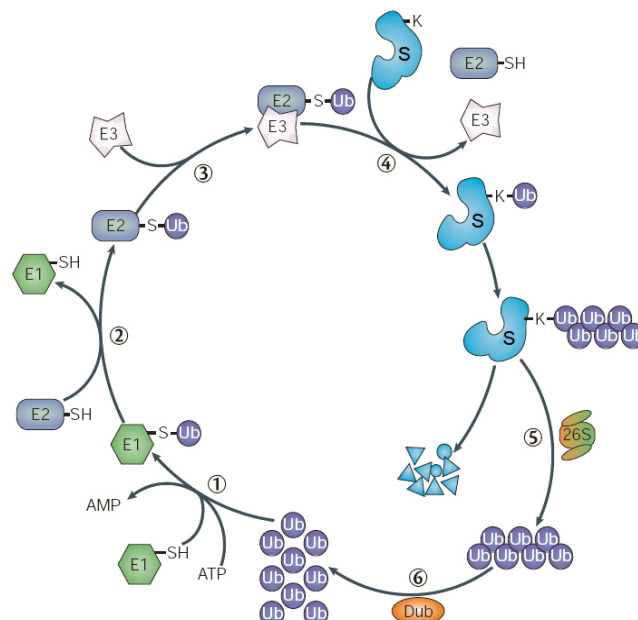
## 1. Einleitung

### 1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Proteolyse in eukaryotischen Zellen wird zum Großteil vom Ubiquitin (Ub)-Proteasom-System (UPS) durchgeführt. Dazu werden Proteine mit einer Kette von Poly-Ub verknüpft, welche dann vom 26S Proteasom abgebaut werden. Die Ubiquitinierung erfolgt durch einen komplexen und streng regulierten Mechanismus. Der kontrollierte Abbau von Proteinen beeinflusst eine Vielzahl zellulärer Vorgänge. Das UPS ist entscheidend an der Regulation der Transkription, Zellzyklusprogression, Signaltransduktion und der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt.

#### 1.1.1. Ub und Ub-Ligasen

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, welches zur posttranslationalen Modifikation von anderen Proteinen dient. Ub wird über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ub und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins mit dem Zielprotein verknüpft (Haas et al., 1982).



#### Abb. 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Aktivierung von Ubiquitin (Ub) erfolgt in Schritt (1) mittels des E1. Das aktivierte Ub wird auf das E2 übertragen (2). Die Substraterkennung erfolgt über das E3 (3+4). Das polyubiquitinierte Substrat (S) wird über das 26S Proteasom zu kleinen Peptiden abgebaut (5). Das Ub wird bei diesem Prozess recycelt (6) (Abb. modifiziert nach Sullivan et al., 2003).

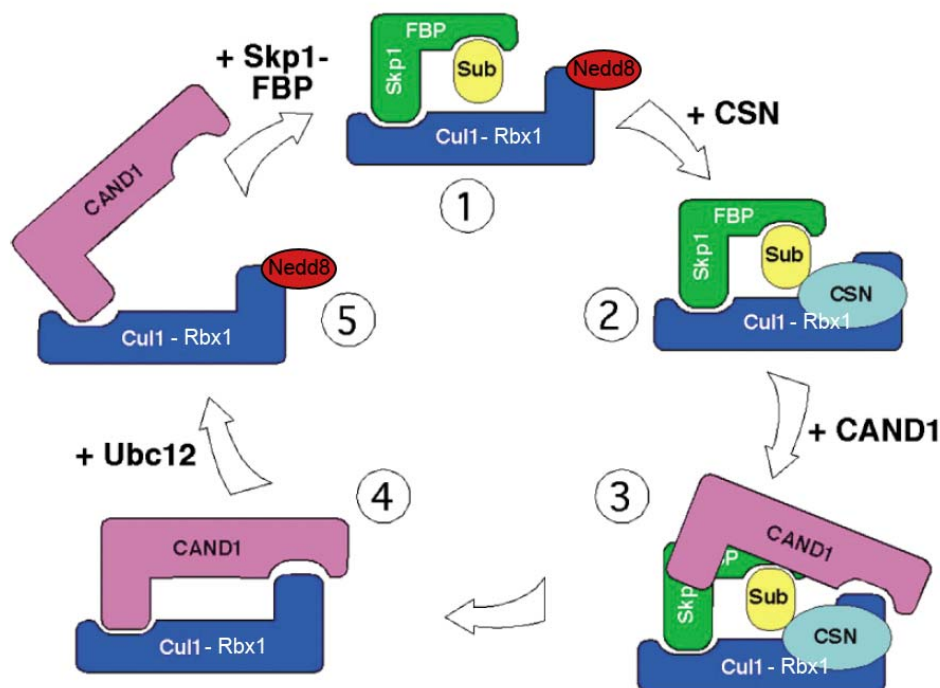
Die Konjugation an den N-Terminus eines Proteins ist ebenfalls möglich (zusammengefasst von Ciechanover und Ben-Saadon, 2004). Für die Markierung von Proteinen mit Ub muss dies vorab aktiviert werden. Eine dreistufige Enzymkaskade bestehend aus einem E1, E2 und E3 ist dafür erforderlich. Zuerst wird eine Thioester-Bindung mit dem Ub-Aktivierungsenzym E1 unter ATP-Verbrauch gebildet. Das aktivierte Ub wird auf ein Ub-konjugierendes Enzym, E2, übertragen. Das E2 interagiert mit den E3-Ligasen, welche für die Substraterkennung notwendig sind. Durch die wiederholte Verknüpfung von Ub mit einem Lysin des Substratproteins erfolgt die Ausbildung einer Poly-Ub-Kette. Die Übertragung vollständiger Poly-Ub-Ketten auf Substrate ist ebenfalls möglich (Li et al., 2007). Das Genom der meisten Eukaryoten kodiert für nur ein E1, mehrere E2s und viele E3s. Dabei ist eine E3-Ligase für die Ubiquitinierung von mehr als einem Zielprotein zuständig (zusammengefasst von Sullivan et al., 2003).

Die E3-Ligasen gliedern sich in drei Familien. Es wird zwischen HECT-, RING-, und U-Box-E3s unterschieden. Der Prototyp der HECT-E3s ist E6-AP. E6-AP ist ein virales Protein und für die Ubiquitinierung von p53 zuständig (Huibregtse et al., 1993; Scheffner et al., 1993). Die HECT (homologous to E6-AP C-terminus)-E3s sind durch eine C-terminale Domäne gekennzeichnet, welche ein konserviertes Cystein besitzt. Dieses bildet als Reaktionsintermediat eine Thioester-Bindung mit dem Ub aus, bevor dieses auf das Substrat übertragen wird. Dadurch sind HECT-E3s direkt an dem Prozess der Konjugation von Ub auf das Zielprotein beteiligt (zusammengefasst von Pickart, 2001).

Die RING (really interesting new gene)-E3s hingegen besitzen Cystein- und Histidinreste, die zur Bindung von Zink-Ionen dienen. Diese Reste sind nicht direkt an der Übertragung des Ub beteiligt. Sie bilden das Gerüst für die Substraterkennung und die Bindung des E2s, welches dann das aktivierte Ub überträgt. Dabei vermittelt die RING-Domäne die Interaktionen der beteiligten Proteine. Vertreter der RING-Ub-Ligasen sind Mdm2, welches als einzelnes Protein Substraterkennung und die Bindung des E2 vermittelt (Honda et al., 1997), sowie den Cullin-RING-Ub-Ligasen (CRLs). Die CRLs bestehen aus einem Cullin (Cul), den Substratadaptoren und einem RING-Protein, welches für die Bindung des E2 notwendig ist. Das Cullin fungiert in diesem Komplex als Gerüstprotein für die Interaktion der Bestandteile der CRLs (zusammengefasst von Tyers und Jorgensen, 2000).



In Menschen sind bisher sieben Culline bekannt: Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 und Cul7 (Dias et al., 2002). Die Interaktionen der Culline mit verschiedenen E2s, sowie mit unterschiedlichen Familien von Substratadaptoren vermitteln die Substratspezifität der einzelnen CRLs. Diese Komplexe enthalten die RING-Box Proteine Rbx1 oder Rbx2. Diese zeigen unterschiedliche Affinitäten zu den jeweiligen Cullinen und haben ebenfalls Einfluss auf die Substraterkennung (Kamura et al., 2004). Die Substratadaptoren der CRLs erkennen meistens mehrere Proteine, außerdem existieren für Substrate wie c-Jun mehrere CRLs (Nateri et al., 2004; Wertz et al., 2004). Dies ermöglicht eine differenzierte Regulation des Abbaus der jeweiligen Substrate.



### Abb. 2: Modell zur Assemblierung von CRLs

Durch die Bindung des CSN an CRLs (1) wird Nedd8 von Cullin abgespalten, was die Assoziation von CAND1 ermöglicht. Dadurch werden die zur Substraterkennung notwendigen Proteine verdrängt, was zur Inaktivierung der CRLs führt. Eine erneute Neddylierung des Cullins bewirkt die Dissoziation von CAND1, was die Bindung der Substratadaptoren ermöglicht (Abb. modifiziert nach Cope und Deshaies, 2003).

Die Culline werden im C-terminalen Bereich durch Nedd8 (neuronally expressed developmentally downregulated 8) modifiziert. Nedd8 ist ein Ub-ähnliches Protein, welches wie Ub über ein E1 und E2 aktiviert wird und über eine Isoeptidbindung an Culline verknüpft wird (Hori et al., 1999; Liakopoulos et al., 1999; Osaka et al., 1998).

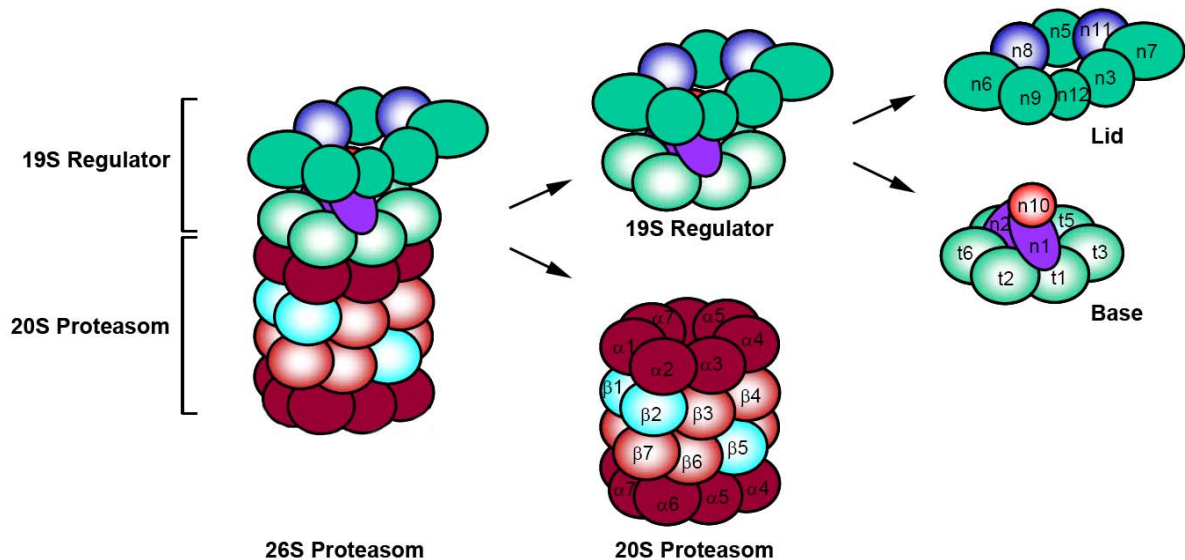
Dies kann die Aktivität der CRLs steigern, möglicherweise aber nur im Zusammenhang mit spezifischen E2s (Petroski und Deshaies, 2005; Read et al., 2000). Die Bindung von Nedd8 an Cullin kann wieder abgespalten werden. Dies geschieht durch Isopeptidasen wie Den1 oder das COP9-Signalosom (Lyapina et al., 2001; Wu et al., 2003) (siehe 2.1.3). Durch die Konjugation/Dekonjugation von Nedd8 wird die Aktivität der CRLs reguliert. Des Weiteren spielt dies bei der Assemblierung der CRLs eine Rolle. Das Heterodimer aus Cullin und Rbx1 bindet CAND1 (Cullin associated, Nedd8 dissociated) wodurch die Bindung der Substratadaptoen verhindert wird. Die Neddylierung verdrängt CAND1 vom Cullin und ermöglicht so die Bindung der Substratadaptoen. Durch die Neddylierung/Deneddylierung kann somit der Austausch der Substratadaptoen am Cullin erfolgen (Goldenberg et al., 2004; Liu et al., 2002; Zheng et al., 2002). Für die Substrate HIF1 $\alpha$  und p27 konnte gezeigt werden, dass diese zusammen mit den entsprechenden Substratadaptoen zur verstärkten Neddylierung der Cullin führen. Dadurch können die Substrate spezifisch die Assemblierung ihrer Ub-Ligase begünstigen (Bornstein et al., 2006; Sufan und Ohh, 2006)

Die U-Box E3s verfügen über eine Domäne, welche eine ähnliche Konformation wie die RING-Domäne einnimmt. Vertreter sind Ufd2, welches die Kettenverlängerung von Poly-Ub-Ketten katalysiert und somit auch als E4 bezeichnet wird (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Ein weiterer Vertreter dieser bisher wenig charakterisierten Gruppe ist CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein), das für die Ubiquitinierung von falsch gefalteten Substraten benötigt wird (Jiang et al., 2001; Kampinga et al., 2003).

### 1.1.2. Das Proteasom

Der Abbau von ubiquitinierten Substraten erfolgt über das 26S Proteasom. Dieses besteht aus dem 20S katalytischen Komplex und dem 19S regulatorischen Komplex (Lupas et al., 1993; Peters et al., 1993). Das 20S Proteasom setzt sich aus 4 heptameren Ringen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammen. Diese bilden einen Hohlzylinder, dessen äußere Ringe aus den  $\alpha$ -Untereinheiten bestehen und dessen innere aus den  $\beta$ -Untereinheiten (siehe Abb. 3). Das 20S Proteasom liegt in der Zelle in verschlossener Form vor, der Zugang in den Zylinder wird durch die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten blockiert. Dadurch sind die katalytisch aktiven Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2

und  $\beta 5$  im 20S Proteasom unzugänglich (Groll et al., 1997). Die aktiven Untereinheiten werden mit N-terminalen Propeptiden synthetisiert. Dies schützt die Zellen vor unspezifischer Proteolyse und verhindert deren N-Acetylierung. Die Propeptide werden in einem autokatalytischen Schritt während der Assemblierung des 20S Proteasoms abgespalten (Seemuller et al., 1996).



### Abb. 3: Aufbau des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom setzt sich aus dem katalytisch aktiven 20S Proteasom und dem 19S Regulator zusammen. Das 20S Proteasom besteht aus 4 heptameren Ringen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Die Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  tragen die aktiven Zentren. Der 19S Regulator wird in „Base“ und „Lid“ Subkomplexe unterteilt. Diese werden in ATPase-Untereinheiten ( $t=Rpt$ ) und nicht-ATPase-Untereinheiten ( $n=Rpn$ ) eingeteilt.

Die aktiven Zentren werden jeweils von den N-terminalen Threoninen der prozessierten Untereinheiten gebildet. Die aktiven Untereinheiten haben unterschiedliche Spaltpräferenzen. Es wird zwischen der tryptischen, chymotryptischen und Caspase-ähnlichen (oder PGPH) Aktivität unterschieden. (Orlowski, 1993). Proteasominhibitoren bilden reversible oder nicht-reversible Bindungen mit den aktiven Zentren und verhindern so die Spaltung von Substraten (Lee und Goldberg, 1998).

Der 19S regulatorische Komplex besteht aus zwei Subkomplexen. Er setzt sich aus der „Base“ und dem „Lid“ zusammen. Der Base-Subkomplex besteht aus sechs ATPasen der AAA-Familie und zwei nicht-ATPase Untereinheiten. Er bindet an die  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms und reguliert so den Zugang zu den aktiven Zentren. Des Weiteren ist er an der Entfaltung der Substratproteine beteiligt. Der Lid-

Subkomplex bindet oberhalb der Base und setzt sich aus acht Proteinen zusammen. Er besitzt eine aktive Untereinheit, Rpn11 (Regulatory particle, non-ATPase-like), die eine deubiquitinierende Aktivität aufweist (Braun et al., 1999; Glickman et al., 1998; Glickman et al., 1998; Verma et al., 2002).

Die Erkennung von ubiquitinierten Substraten erfolgt über den 19S Komplex. Dieser bindet Proteine mit Ketten von vier oder mehr Ubiquitinen, die von den Untereinheiten Rpn10 oder Rpt5 (Regulatory particle, ATPase-like) erkannt werden (Elsasser et al., 2004; Lam et al., 2002). Rpn10 scheint darüber hinaus an dem Transport von ubiquitinierten Proteinen zum 26S Proteasom beteiligt zu sein (Chen und Madura, 2002). Die Substrate werden unter ATP-Verbrauch entfaltet und die Poly-Ub-Kette wird von Rpn11 abgespalten. Im 20S Proteasom werden diese zu kleineren Peptiden abgebaut (Yao und Cohen, 2002).

Neben dem 19S Regulator sind weitere Komplexe bekannt, welche an das 20S Proteasom binden können. Der 11S Regulator oder auch PA28 besteht aus sieben Untereinheiten. Diese können in der Komposition  $\alpha 3\beta 4$  oder  $\gamma 7$  vorkommen. Sie sind an der Generierung von Peptiden beteiligt, welche über den MHC (major histocompatibility)-Klasse-I-Komplex präsentiert werden (Knowlton et al., 1997). Der PA200-Regulator (oder Blm3 bzw. Blm10 in *Saccharaomyces cerevisiae*) scheint an der DNA-Reparatur und der Assemblierung des 26S Proteasoms beteiligt zu sein (Fehlker et al., 2003; Ustrell et al., 2002).

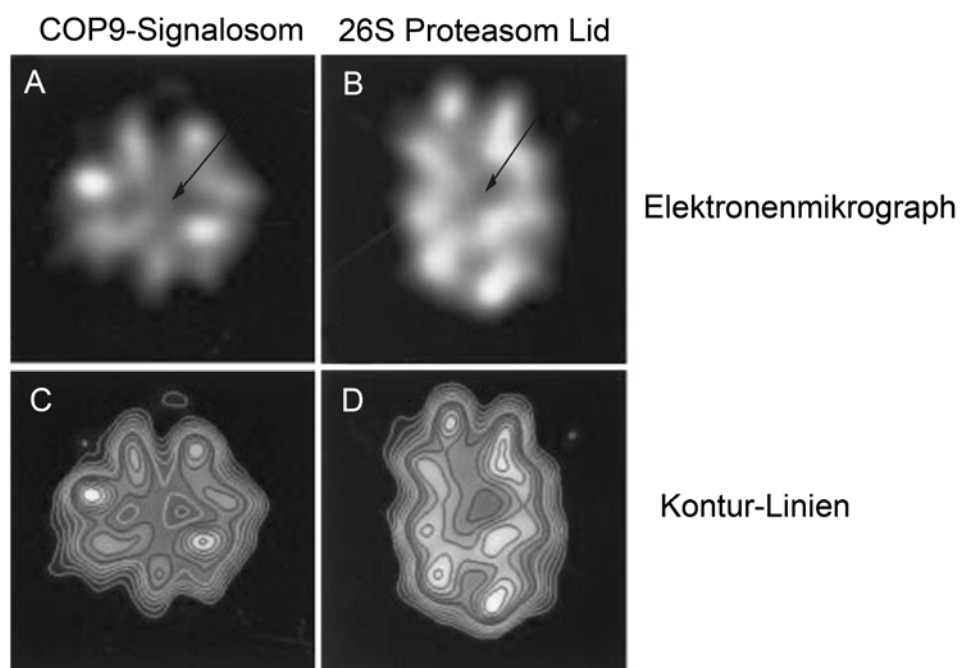
## **1.2. Das COP9-Signalosom**

### **1.2.1. Aufbau des COP9-Signalosoms (CSN)**

Das COP9-Signalosom (constitutive photomorphogenic) ist ein Proteinkomplex aus 8 Proteinen (Seeger et al., 1998). Das CSN wurde in *Arabidopsis thaliana* bei der Analyse von Mutanten mit konstitutiver Photomorphogenese entdeckt (Wei und Deng, 1992). Für drei der identifizierten Mutanten, COP8, COP9 und COP11 konnte nachgewiesen werden, dass sie zu einem Proteinkomplex gehören (Wei et al., 1994). Der Komplex ist für die Photomorphogenese von zentraler Bedeutung, da er die Etiolierung der Pflanzen bei Wachstum in Dunkelheit steuert. Die Deletion (Knockout) des Komplexes ist letal für die Keimlinge.

Der Komplex wurde danach in weiteren Organismen identifiziert, bisher ist er in allen Eukaryoten nachgewiesen. Für die Untereinheiten des CSN existiert eine vereinheitlichte Nomenklatur. Diese werden nach absteigendem Molekulargewicht CSN1-8 genannt (Deng et al., 2000). In *A. thaliana* existieren von den Untereinheiten CSN5 und CSN6 jeweils zwei Isoformen (Gusmaroli et al., 2004; Gusmaroli et al., 2007; Kwok et al., 1998; Peng et al., 2001). CSN7 kommt im Menschen und in der Maus in zwei Isoformen, CSN7a und b, vor (Wei und Deng, 1998).

Die CSN-Untereinheiten weisen Ähnlichkeiten zu denen des Lid vom 26S Proteasom auf (Henke et al., 1999). Jeder Untereinheit des CSN kann eine paraloge Untereinheit im Lid zugewiesen werden (Wei und Deng, 2003). Die Untereinheiten zeichnen sich durch gemeinsam vorkommende Proteindomänen aus. CSN5 und CSN6 im CSN sowie RPN11 und Rpn8 des Lid besitzen eine N-terminale MPN-Domäne (Mpr1, Pad1 N-terminal), die anderen Untereinheiten enthalten eine C-terminale PCI-Domäne (Proteasome, COP9 signalosome, Initiation factor 3) (Hofmann und Bucher, 1998; Maytal-Kivity et al., 2002; Wei et al., 1998).



**Abb. 4: Elektronenmikrographen des COP9-Signalosoms und des Lid**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des COP9-Signalsosoms (A) und des 26S Proteasom Lid (B) zeigen die asymmetrische Verteilung der Untereinheiten. Die Pfeile kennzeichnen die zentrale Furche der Komplexe. In (C) und (D) sind die Kontur-Linien der Komplexe abgebildet (Abb. modifiziert nach Kapelari et al., 2000).

Dadurch ergibt sich die „6+2“-Komposition des Lid und des CSN. Diese ist allerdings nicht konserviert. In *Schizosaccharomyces pombe* und *S. cerevisiae* existieren CSN-ähnliche Komplexe, die von dem „6+2“ Aufbau abweichen (Maytal-Kivity et al., 2002; Mundt et al., 1999). In *Neurospora crassa* fehlt dem CSN Komplex die Untereinheit CSN8. Die Untereinheiten selbst sind hoch konserviert (He et al., 2005). Dies gilt für CSN2 und CSN5 im besonderen Maße, zwischen *Homo sapiens* und *A. thaliana* sind über 60% der Aminosäuren identisch.

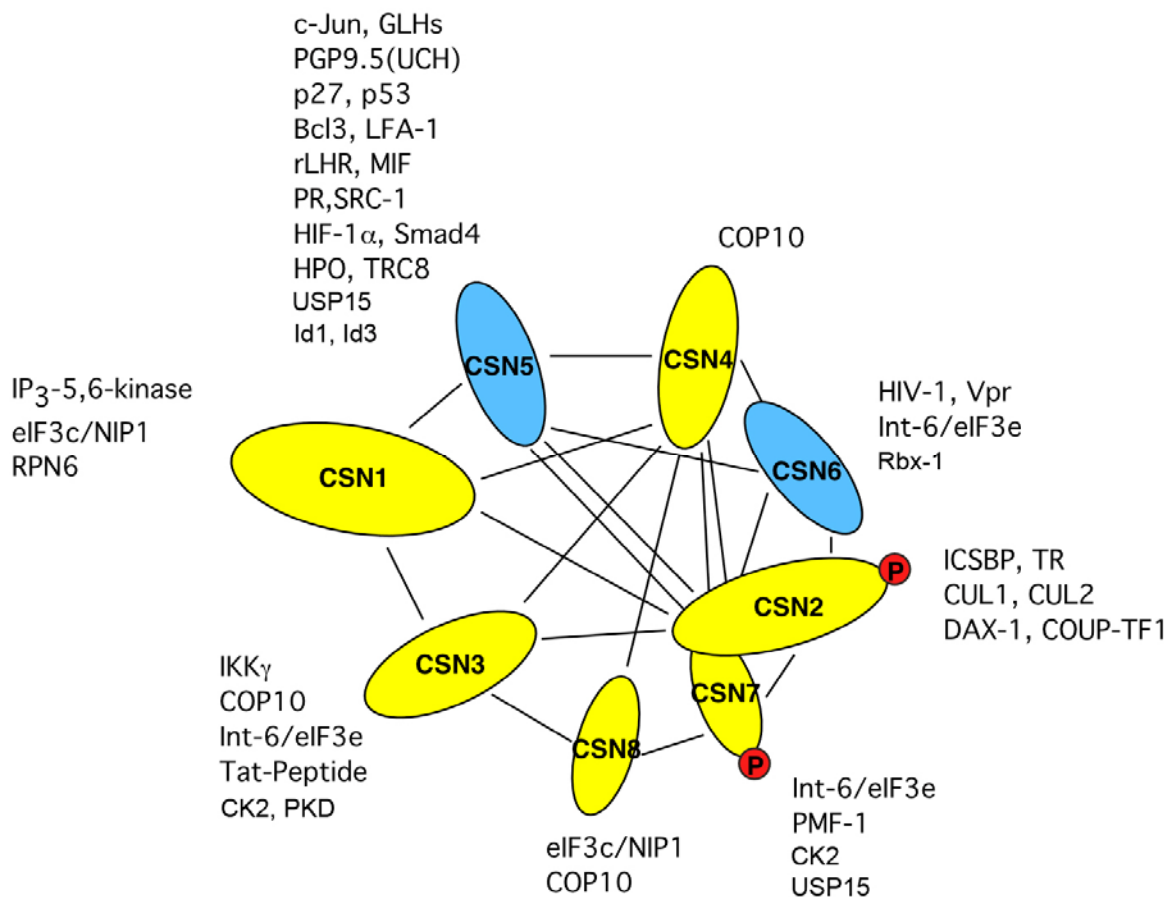
Die Anordnung der Untereinheiten im Komplex wurde mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen des aufgereinigten CSN untersucht. Die Elektronenmikrographen zeigen eine hohe Variabilität der Form des CSN. Eine asymmetrische Anordnung der Untereinheiten und eine zentrale Furche sind jedoch charakteristisch. Des Weiteren ist eine Di- bzw. Oligomerisierung des Komplexes beobachtet worden. Der Lid-Subkomplex zeigt in entsprechenden Versuchen ähnliche Strukturmerkmale (Kapelari et al., 2000).

Die Wechselwirkungen der einzelnen Untereinheiten des CSN miteinander sind mittels diversen Methoden untersucht worden (Freilich et al., 1999; Fu et al., 2001; Kapelari et al., 2000; Kwok et al., 1998). Es gibt eine Vielzahl an Interaktionen der Untereinheiten miteinander, für deren Ausbildung vor allem die PCI-Domänen notwendig sind. Diese alleine sind jedoch nicht ausreichend für den Einbau in den Komplex (Huang et al., 2005; Tsuge et al., 2001). Weiterhin sind für die Integrität des Komplexes Cystein-Reste notwendig (Hetfeld et al., 2005).

### **1.2.2. Interaktionspartner und Aktivitäten des CSN**

Das CSN interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen. Hierbei handelt es sich vor allem um Transkriptionsfaktoren, welche über das Proteasom abgebaut werden. Ein Großteil dieser Interaktionen wird über CSN5 vermittelt (zusammengefasst von Bech-Otschir et al., 2005). Eine weitere Gruppe von CSN-bindenden Proteinen umfasst Bestandteile von CRLs. Culline binden an CSN2 und Rbx1 interagiert mit CSN6 (Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001). Des Weiteren binden Kinasen und das deubiquitinierende Enzym USP15 (Ubiquitin specific protease) an das CSN (Hetfeld et al., 2005; Uhle et al., 2003; Zhou et al., 2003). Zusammen mit der intrinsischen Deneddylierungsaktivität von CSN5 ergeben sich daraus weitere CSN-assoziierte Aktivitäten. So verfügt das CSN über eine Kinaseaktivität, die durch die

Kinasen CK2, PKD, Akt und IP<sub>3</sub>-5,6-Kinase bereitgestellt wird (Huang et al., 2006; Uhle et al., 2003; Wilson et al., 2001)



**Abb. 5: Interaktionen der CSN-Untereinheiten**

Die CSN-Untereinheiten zeigen vielfältige Interaktionen miteinander. Diese werden schematisch durch die Verbindungslinien zwischen den Proteinen angegeben. Die Bindung von weiteren Proteinen erfolgt vor allem über CSN5, welches eine Reihe von proteasomalen Substraten bindet. Weiterhin interagieren Bestandteile von Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen mit dem CSN, sowie Kinasen und das deubiquitiniierende Enzym USP15 (Abb. modifiziert nach Kapelari et al., 2000).

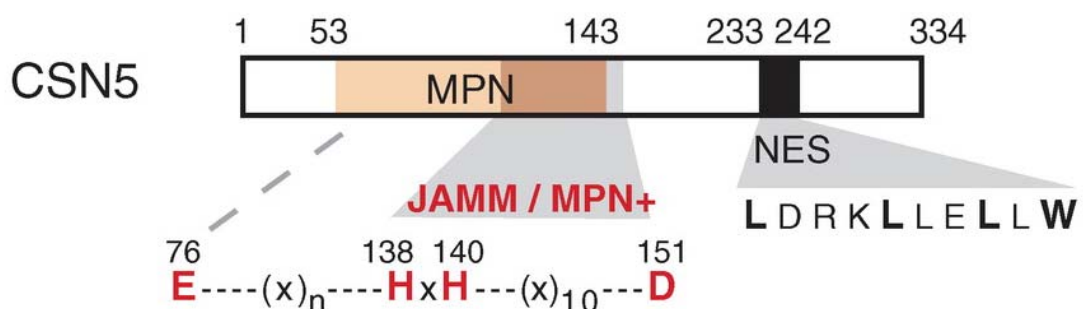
Dies führt zur Phosphorylierung der Untereinheiten CSN2 und CSN7, sowie einer Vielzahl von proteasomalen Substraten (Uhle et al., 2003). Dazu zählen Transkriptionsfaktoren wie p53 und c-Jun, deren Abbau durch die Phosphorylierung beeinflusst wird (Bech-Otschir et al., 2001; Naumann et al., 1999). Die CSN assoziierten Kinasen phosphorylieren c-Jun im N-terminalen Bereich, was zu dessen Stabilisierung führt. c-Jun gehört zu der Familie der basischen Leuzinzipper und ist ein Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors (activating protein-1). Die Phosphorylierung von c-Jun durch die CSN-assoziierten Kinasen hat eine Steigerung

der AP-1-Aktivität zur Folge. Eine Phosphorylierung von p53 hingegen führt zu dessen proteasomalen Abbau. Die Kinaseaktivität kann durch Inhibitoren wie Curcumin, Emodin oder Piceatannol gehemmt werden (Fullbeck et al., 2005). Dabei zeigen die an das CSN gebundenen Kinasen eine gesteigerte Affinität zu den Hemmstoffen gegenüber den freien Kinasen (Uhle et al., 2003).

Eine Interaktion des CSN mit dem Proteasom konnte in *A. thaliana* und in Maus-Fibroblasten gezeigt werden (Huang et al., 2005; Peng et al., 2003). Das CSN bindet an das 26S Proteasom über die Base-Untereinheiten. Dadurch kommt es zur Verdrängung des Lids und zur Reduktion der proteolytischen Aktivität des Proteasoms (Huang et al., 2005). Aufgrund dieser Daten wurde über eine Funktion des CSN als alternativer Lid des 26S Proteasoms spekuliert (Li und Deng, 2003).

### 1.2.3. Regulation von CRLs durch das CSN

Die Deubiquitinierungs- und Deneddylierungsaktivität des CSN sind für die Funktion von CRLs von Bedeutung. Mittels genetischer und biochemischer Methoden konnte Deneddylierung von Cullinen durch das CSN nachgewiesen werden (Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001). Diese Aktivität wird der Untereinheit CSN5 zugewiesen (Cope et al., 2002). Das aktive Zentrum liegt in der MPN-Domäne von CSN5, welche auch als JAMM- oder MPN<sup>+</sup>-Domäne bezeichnet wird, um sie von der katalytisch inaktiven MPN-Domäne von CSN6 abzugrenzen (Maytal-Kivity et al., 2002).



**Abb. 6: MPN<sup>+</sup>-Domäne von CSN5**

Der schematische Aufbau von CSN5 und seiner Domänenstruktur zeigt die Lokalisation des JAMM-Motivs in der MPN-Domäne. Für die Isopeptidaseaktivität sind konservierte Aminosäurereste notwendig, welche rot hervorgehoben sind (Abb. modifiziert nach Wei und Deng, 2003).



Die Assemblierung und Aktivität von CRLs wird durch die Modifikation mit Nedd8 stimuliert. Dessen Abspaltung durch das CSN führt zu deren Inaktivierung. Dies ist in *in vitro*-Versuchen gezeigt worden (Read et al., 2000). Die Ub-Ligase-Aktivität von CRLs wird durch die Anwesenheit des CSN *in vitro* inhibiert (Groisman et al., 2003). Für die Funktion von CRLs *in vivo* ist jedoch ein intaktes CSN notwendig (Schwechheimer et al., 2001). Daher ergibt sich die Hypothese, dass Zyklen von Neddylierung und Deneddylierung die Aktivität der CRLs reguliert (Lyapina et al., 2001).

Das CSN und USP15 sind an der Assemblierung der CRLs beteiligt. Die Kernkomponenten der CRLs zeigen eine hohe Stabilität, die Substratadaptoren hingegen haben häufig geringere Halbwertszeiten. Diese können durch Autoubiquitinierung in den CRLs abgebaut werden (Zhou und Howley, 1998). Hierfür ist möglicherweise die räumliche Nähe der Substratadaptoren zu den Ubiquitin-übertragenden E2s in den CRLs verantwortlich. Bei Abwesenheit des Substrates kommt es zum umgehenden Abbau des Adaptors. Dies wird jedoch durch die Aktivität von USP15 am CSN verhindert. USP15 stabilisiert CRLs, indem es der Autoubiquitinierung entgegenwirkt. Die Assemblierung von CRLs am CSN zum Abbau eines spezifischen Substrates kann so durch das CSN und USP15 unterstützt werden. Danach werden diese freigesetzt und können ihre Substrate abbauen. (zusammengefasst von Wolf et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rbx1 und Substratadaptoren durch USP15 stabilisiert werden (Hetfeld et al., 2005; Wee et al., 2005). Dabei kommt es zu keinem additiven Effekt eines CSN5- und USP15-Doppelknockouts, was für eine Funktion in einer Epistasisgruppe spricht. Das CSN ist außerdem für die korrekte Lokalisierung von USP15 im Zellkern notwendig (Zhou et al., 2003).

#### **1.2.4. Knockout- und Knockdown-Studien des CSN**

Eine Reduktion von CSN-Untereinheiten hat die Destabilisierung von CRLs zur Folge. In diversen Zellkulturexperimenten können reduzierte Mengen von F-Box-Proteinen nach der Depletion von CSN-Untereinheiten durch siRNA (Knockdown) nachgewiesen werden (Cope und Deshaies, 2006; Denti et al., 2006). Der beschleunigte Abbau von Cullinen wurde in CSN-Knockouts von *N. crassa* und *Drosophila melanogaster* gezeigt (He et al., 2005; Wu et al., 2005). Diese

Destabilisierung der Culline in *D. melanogaster* betrifft die neddylierte Form, weshalb über einen Zusammenhang zwischen Aktivierung und autokatalytischem Abbau der CRLs spekuliert wird (Wu et al., 2005).

Der Knockout von CSN-Untereinheiten führt zu einem pleiotropen Phänotyp. Dabei ist der Knockout in höheren Organismen letal. In *A. thaliana*, *D. melanogaster* oder *Mus musculus* führt dies zu Entwicklungsstörungen, was den Tod zur Folge hat. (Dohmann et al., 2005; Gusmaroli et al., 2007; Lykke-Andersen et al., 2003; Oron et al., 2002). Dies kann durch die fehlende Aktivität der CRLs nach dem Knockout des CSN erklärt werden. Durch die reduzierten Mengen an Substratadaptoren akkumulieren die entsprechenden Substrate. In den Blastocysten eines *csn2*-Knockouts in *M. musculus* sind erhöhte Mengen von CyclinE, p53 und p21 nachgewiesen worden. Dies könnte zu dem Wachstumsarrest und Absterben der Zellen des CSN-Knockouts beitragen (Lykke-Andersen et al., 2003).

Die Knockouts der verschiedenen CSN-Untereinheiten zeigen unterschiedliche Phänotypen, was die Effekte auf die anderen Untereinheiten betrifft. Der Knockdown von CSN5 beeinflusst die Expression der anderen Untereinheiten nicht (Cope und Deshaies, 2006; Groisman et al., 2003; Oron et al., 2002). Diese sind zudem in der Lage einen Komplex zu bilden, welcher kein CSN5 enthält (Oron et al., 2002). Dieser Komplex ist entsprechend in seiner Deneddylaseaktivität gehemmt. Dagegen ist in den Knockout von CSN8 in *A. thaliana* kein CSN-Komplex mehr nachweisbar, die monomeren Formen von CSN5 und CSN7 sind weiterhin vorhanden (Dohmann et al., 2005). Ebenso führt der Knockdown von CSN3 in Maus-Fibroblasten zur Reduktion des gesamten CSN-Komplexes (Yoneda-Kato et al., 2005). Der Knockdown von CSN5 oder CSN4 mittels siRNA hingegen beeinflusst nur die Transkription der entsprechenden Untereinheit, nicht aber der jeweils anderen (Denti et al., 2006). Die Expression der Untereinheiten scheint auf der Translationsebene koordiniert zu werden.

Der Knockout von CSN-Untereinheiten führt in *Caenorhabditis elegans* zu Defekten der Mikrotubuli. Während der Mitose resultiert dies zu Fehlern bei der Positionierung der mitotischen Spindel und deren Polymerisierung. Dies wird durch die verzögerte Degradation von Mei-1 verursacht, welches die Durchtrennung von Mikrotubulifilamenten katalysiert (Pintard et al., 2003).

### 1.3. Mikrotubuli

#### 1.3.1. Aufbau von Mikrotubuli

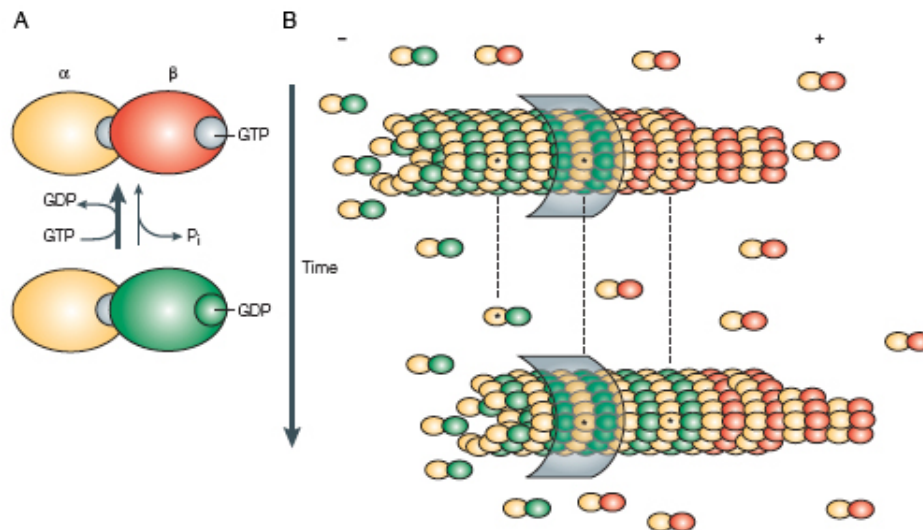
Mikrotubuli bestehen aus Polymeren von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Dimeren. Die Tubulin-Monomere können beide GTP binden (Nogales et al., 1998). Die Hydrolyse von GTP zu GDP findet an  $\beta$ -Tubulin statt. Dies geschieht während der Polymerisierung der Heterodimere zu Protofilamenten (Grover und Hamel, 1994). Die Protofilamente bilden einen Hohlzylinder, welcher sich aus Strängen von 13 Protofilamenten zusammensetzt (siehe Abb. 7) (Chretien et al., 1992). Mikrotubulifilamente haben einen Durchmesser von 25 nm und zeichnen sich auf der lateralen Achse durch eine helikale Struktur aus (Weber et al., 1978). Dadurch entsteht eine Diskontinuität zwischen den Protofilamenten des Hohlzylinders (Sosa und Milligan, 1996). Diese als „microtubule seam“ bezeichnete Stelle ist der bevorzugte Punkt für den Zusammenbruch der Mikrotubuli (Mandelkow et al., 1986).

Mikrotubulifilamente besitzen eine Polarität, die zwischen dem (+)- und (-)-Ende unterscheidet. Das (+)-Ende schließt mit  $\beta$ -Tubulin ab, während das (-)-Ende durch  $\alpha$ -Tubulin gekennzeichnet ist (Chretien et al., 1996). Am (+)-Ende der Mikrotubuli befindet sich eine aufgefaltete, zweidimensionale Struktur, die als „sheet“ bezeichnet wird. In diesem Bereich sind die einzelnen Protofilamente noch nicht zu einem Hohlzylinder zusammengeschlossen (siehe Abb. 10) (Arnal et al., 2000). Die Polymerisierung der Filamente findet bevorzugt am (+)-Ende statt. Die Dissoziation kann am (-)-Ende erfolgen, sofern dies frei vorliegt. In der Zelle ist dies jedoch nicht der Fall, hier ist das (-)-Ende in eine Matrix aus  $\gamma$ -Tubulin eingebettet. Dadurch kann am (-)-Ende keine Depolymerisierung erfolgen. Innerhalb der Zelle existieren Populationen von Mikrotubulifilamenten, die sich im Zustand der Polymerisierung oder Depolymerisierung befinden (Sammak und Borisy, 1988). Diese stehen in einem Gleichgewicht zueinander, was als „dynamische Instabilität“ bezeichnet wird (zusammengefasst von Desai und Mitchison, 1997). Die (-)-Enden gehen in der Zellen vom „microtubule organizing centre“ (MTOC) oder Centrosom aus (Tassin und Bornens, 1999). Dieses enthält neben dem  $\gamma$ -Tubulin diverse Proteine, die für die Verankerung und Nukleation von Mikrotubuli notwendig sind (zusammengefasst von Bornens, 2002). Des Weiteren befinden sich Bestandteile des UPS im Centrosom, was für das 26S Proteasom und CRLs nachgewiesen wurde (Freed et al., 1999; Wigley et al., 1999). Eine Inhibition des Proteasoms verstärkt die Assoziation des

Proteasoms mit dem Centrosom (Fabunmi et al., 2000). Die Lokalisation des Proteasoms im Centrosom scheint für die Funktion des UPS in der Hefe notwendig zu sein (zusammengefasst von Gordon, 2002).

### 1.3.2. Funktion von Mikrotubuli

Die Mikrotubulifilamente werden für diverse zelluläre Funktionen benötigt. Sie sind maßgeblich an der Ausbildung der Zellform, der Zellmotilität, dem Transport von Vesikeln und dem Aufbau des Spindelapparates während der Mitose beteiligt (Hirokawa et al., 1998).



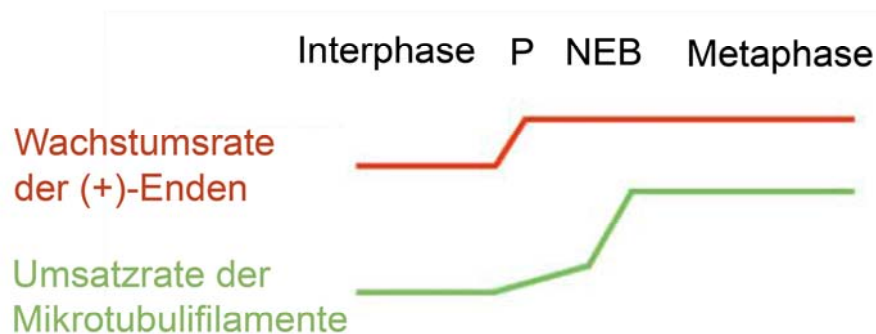
**Abb. 7: Dynamik der Mikrotubulipolymerisierung**

Mikrotubulifilamente bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Dimeren (A). Die Polymerisierung erfolgt am (+)-Ende unter GTP-Verbrauch. Die Mikrotubulifilamente bilden einen Hohlzylinder aus 13 Protofilamenten. Im Falle eines freien (-)-Endes, kann dort eine Dissoziation der Tubulin-Heterodimere erfolgen (B). (Abb. von Galjart, 2005).

Der intrazelluläre Transport entlang der Mikrotubuli erfolgt über Motorproteine. Dynein ist für den retrograden und Kinesin für den anterograden Transport zuständig (zusammengefasst von Mallik und Gross, 2004). Dyneine können auch falsch gefaltete und aggregierte Proteine transportieren. Diese werden dann in den Aggressomen abgelagert (Garcia-Mata et al., 1999), die auch das 26S Proteasom, Chaperone und Ubiquitin enthalten (Fratta et al., 2005; Wigley et al., 1999). Es wird angenommen, dass die Mikrotubuli die Substrate zu den Aggressomen

transportieren, wo sie dann durch das UPS abgebaut werden (Ardley et al., 2003; Johnston et al., 2002).

Die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose erfordert eine Umbildung der Mikrotubulifilamente. Dies ist durch die Limitierung an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Dimeren bedingt. Während der Mitose kommt es zu einem Anstieg der Polymerisierungsraten der Mikrotubuli. Nach dem Zusammenbruch der Kernmembran steigt auch der Umsatz der Filamente, was durch den Aufbau des Spindelapparates verursacht wird. Dessen astrale Mikrotubuli sind für die korrekte Positionierung der Spindel von Bedeutung. Diese zeichnen sich durch hohe Polymerisierungs- und Zerfallsraten aus (zusammengefasst von Kline-Smith und Walczak, 2004).



**Abb. 8: Globale Veränderungen der Mikrotubuli während des Zellzyklus**

Die Mitose und der Aufbau des Spindelapparates erfordern eine Reorganisation der Mikrotubulifilamente. Die Polymerisierungsraten steigen zu Beginn der Prophase (P) an und verbleiben auf dem erhöhten Niveau während der Mitose. Mit dem Abbau der Kernmembran (NEB) kommt es zu einer starken Zunahme des Umsatzes an Mikrotubulifilamenten. Die Ursachen für diese Veränderungen in der Mikrotubulidynamik sind die hohen Polymerisierungs- und Zerfallsraten der astralen Mikrotubuli des Spindelapparates während der Mitose (Abb. modifiziert nach Kline-Smith und Walczak, 2004).

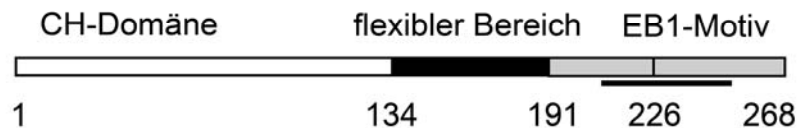
Die Stabilität und Polymerisierung von Mikrotubulifilamenten wird durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) reguliert. Diese können durch die Bindung an die (+)-Enden die Polymerisierungsraten erhöhen oder zum Zusammenbruch der Filamente führen, indem sie diese Durchtrennen (zusammengefasst von Howard und Hyman, 2003). MAPs werden ebenfalls für die Verankerung von Mikrotubuli an der Cytoplasmamembran benötigt. Erreichen Mikrotubulifilamente den Zellkortex unterhalb der Cytoplasmamembran, tritt eine Stabilisierung dieser Filamente ein. Dies wird durch CLIP-170 (Cytoplasmatic linker protein) vermittelt, welches die

Verbindung zwischen den (+)-Enden der Mikrotubuli und der Membran bildet. Populationen von stabilen Mikrotubuli sind maßgeblich an der Ausbildung der Zellmorphologie beteiligt (Komarova et al., 2002).

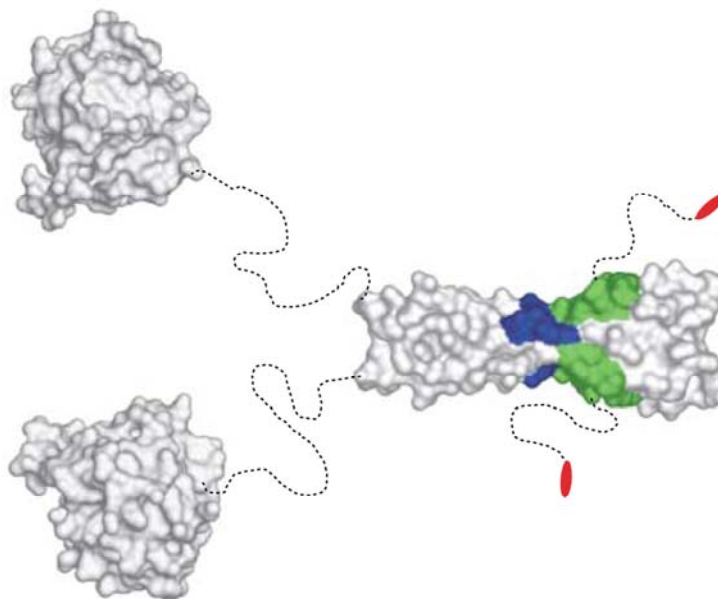
### 1.3.3. Das EB1-Protein

Das EB1-Protein (microtubule-end-binding) gehört zu den MAPs. Durch die präferentielle Bindung an die (+)-Enden der Mikrotubuli kommt es zu deren Stabilisierung und einer Erhöhung der Polymerisierungsraten (Mimori-Kiyosue et al., 2000).

A



B



**Abb. 9: Domänenorganisation von EB1**

EB1 besteht aus zwei Domänen, die durch einen flexiblen Bereich getrennt werden. Im N-Terminus befindet sich die Calponin-Homologie (CH)-Domäne, welche die Bindung an Mikrotubuli vermittelt. Im C-terminalen Bereich befindet sich die EB1-Domäne, die für die Dimerisierung von EB1 und dessen Interaktion mit anderen Proteinen notwendig ist (A). Die Kristallstrukturen der Domänen von EB1 sind zu einem Modell zusammengesetzt. Die hydrophoben Oberflächenstrukturen im C-Terminus, welche die Bindung von Proteinen vermitteln, sind farblich hervorgehoben (B) (Abb. modifiziert nach Honnappa et al., 2005).

EB1 wurde ursprünglich als Interaktionspartner des Tumorsuppressorproteins APC (Adenomatous Polyposis Coli) charakterisiert (Su et al., 1995). Mutationen oder Deletionen der EB1-Bindungsstelle des APC führen zu kolorektalen Tumoren im frühen Erwachsenenalter (Bienz, 2002).

EB1 gehört zu einer in Eukaryoten konservierten Proteinfamilie, deren Vertreter an die (+)-Enden von Mikrotubuli binden (Bu und Su, 2001). Die Bindung an die Mikrotubuli wird durch den N-Terminus vermittelt, welcher eine Calponin-Homologie (CH)-Domäne besitzt (Hayashi und Ikura, 2003). Dieses Proteinmotiv findet sich in vielen Cytoskelett-assoziierten Proteinen (Bramham et al., 2002; Wei et al., 2007). Die CH-Domäne wurde zuerst in Aktin-bindenden Proteinen entdeckt, welche im Gegensatz zu EB1, zwei aufeinanderfolgende CH-Domänen besitzen (Goldsmith et al., 1997). Für die Bindung an Mikrotubulifilamente ist die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich (Hayashi und Ikura, 2003). Die Aktivität von EB1 wird durch dessen C-Terminus beeinflusst. Dieser besitzt einen flexiblen Bereich, welcher von p150<sup>Glued</sup>, einem Bestandteil des Dyneins, gebunden werden kann. Diese Interaktion reguliert die Bindung von EB1 an Mikrotubuli, indem die CH-Domäne exponiert wird. (Hayashi et al., 2005). Der C-Terminus von EB1 besteht aus zwei alpha-Helices, welche durch einen Coiled-Coil getrennt werden. Der C-Terminus bildet eine homodimere Struktur aus (Honnappa et al., 2005; Slep et al., 2005). Die Ausbildung des Dimers ist für die Bindung von Interaktionspartnern wie APC notwendig. Mutationen, welche zum Verlust der Dimerisierung führen, verhindern ebenfalls die Bindung von Interaktionspartnern (Slep et al., 2005). Diese Bindungen werden durch eine konservierte Oberflächenstruktur von hydrophoben Aminosäuren vermittelt (Honnappa et al., 2005).

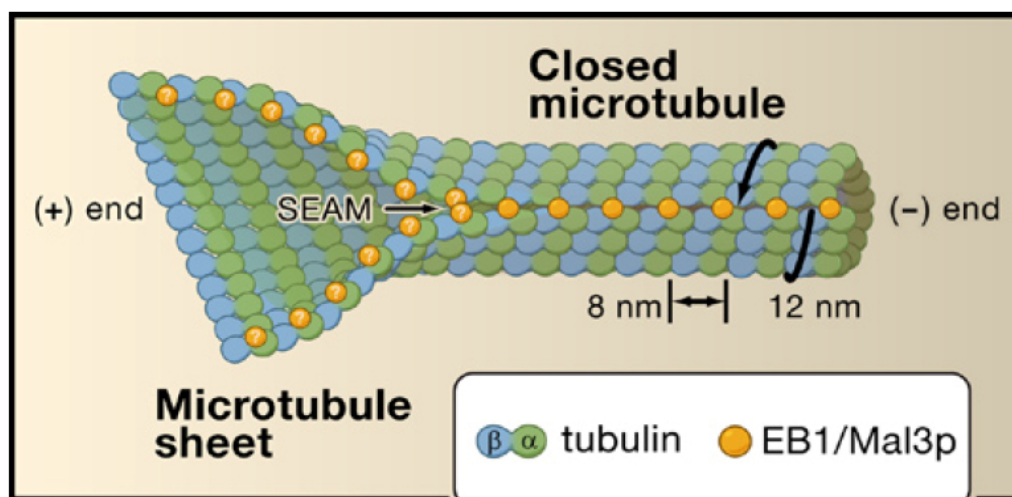
Im Menschen enthält die EB1-Proteinfamilie drei Vertreter (EB1, EBF3 und RP1). Diese haben unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Interaktionspartnern von EB1 (Bu und Su, 2001). Die homologen Proteine in *S. pombe* und *S. cerevisiae* heißen Mal3p bzw. Bim1p. Deletionsmutanten von *mal3* in *S. pombe* können durch humanes EB1 komplementiert werden (Beinhauer et al., 1997), was auf eine hohe Konservierung von EB1 hinweist.

Die Assoziation mit APC verhindert die Bindung des EB1 an p150<sup>Glued</sup> aufgrund einer Überlappung der Bindungsstellen der beiden Proteine am EB1 (Askham et al., 2002). Weitere Interaktionspartner von EB1 sind die  $\beta$ 7/PRE4 Untereinheit des 20S Proteasoms in *S. cerevisiae* (Cagney et al., 2001), sowie das Protein Moe1 in

*S. pombe*. Für die Bindung des EB1 an die 20S Proteasomuntereinheit konnte bisher keine physiologische Bedeutung gezeigt werden. Moe1 besitzt Homologien zur eIF3d-Untereinheit des eIF3-Komplexes und ist an der Regulation der Stabilität von Mikrotubuli beteiligt. Deletionsmutanten von *mal3* und *moe1* sind aufgrund von Chromosomen-Missegregationen bei niedrigen Temperaturen letal. Die Daten zeigen, dass die Ausbildung einer funktionierenden Spindel und die Chromosomen-Segregation während der Mitose die Kooperation zwischen Moe1 und EB1 erfordert (Chen et al., 2000). Die Bedeutung von Bim1p in *S. cerevisiae* wird dadurch deutlich, dass die Deletion von *bim1* mit einer Vielzahl von anderen Genen (41 von 88 getesteten) eine synthetische Letalität aufweist, zu welchen vor allem Gene mit Zellform- und Mitose-assoziierten Funktionen gehören (Tong et al., 2004).

#### 1.3.3.1. Die Rolle des EB1 bei der Polymerisierung der Mikrotubuli

Der C-Terminus von EB1 vermittelt dessen Lokalisation am Centrosom (Louie et al., 2004). Eine Inhibition der Polymerisierung von Mikrotubuli führt zur ausschließlichen Lokalisation von EB1 am Centrosom (Musa et al., 2003). Das Centrosom ist für die Polymerisierung der Mikrotubuli nicht notwendig (Tirnauer et al., 1999), dient möglicherweise aber für die Beladung von neu gebildeten Mikrotubuli mit EB1 (Musa et al., 2003; Rehberg und Graf, 2002).



**Abb. 10: Rolle von EB1 bei der Stabilisierung von Mikrotubuli**

EB1 bindet mit hoher Affinität an das (+)-Ende von Mikrotubuli. Die Protofilamente der Mikrotubuli müssen bei der Polymerisierung von der offenen in eine geschlossene Röhrenkonformation übergehen. EB1 stabilisiert Filamente, indem es an der Nahtstelle der Protofilamente bindet und diese zusammenhält (Abb. von Kikkawa und Metlagel, 2006).



EB1 bindet präferentiell an die Enden von polymerisierenden Mikrotubuli, unabhängig von einer Interaktion mit APC (Morrison et al., 1998). Die Bindung an die (+)-Enden der Mikrotubuli der beiden Proteine ist unabhängig voneinander, weshalb beide alleine Mikrotubulifilamente stabilisieren können (Kita et al., 2006). Eine Bindung von EB1 über die gesamte Länge der Mikrotubuli kann vor allem bei Überexpression von EB1 beobachtet werden (Ligon et al., 2003; Reilein und Nelson, 2005). Die Assoziation der Mikrotubuli mit EB1 erhöht deren Stabilität, sowie die Polymerisierungsrate. Die Dissoziation des Mal3p-Proteins führt zum umgehenden Zusammenbruch der Mikrotubuli (Busch und Brunner, 2004).

Mal3p stabilisiert durch seine Bindung an Mikrotubulifilamente die Nahtstelle zwischen den Protofilamenten bei der Ausbildung des Hohlzylinders. Mal3p verhindert außerdem eine Öffnung der bereits geschlossenen Zylinder durch eine Assoziation mit dem „Lattice Seam“ auf ganzer Länge der Mikrotubulifilamente (Sandblad et al., 2006).

### **1.3.3.2. Die Rolle von EB1 im Zellzyklus**

Die präzise Duplikation des genetischen Materials und die anschließende akkurate Segregation in die Tochterzellen sind essentielle Eigenschaften des eukaryotischen Zellzyklus. Genetische Stabilität ist Voraussetzung für das Überleben von Organismen und genetische Instabilität ist ein Charakteristikum vieler Tumorzellen. Mikrotubuli und EB1 spielen eine wichtige Rolle bei der Zellzyklus-abhängigen Chromosomen-Segregation. Mehrere Publikationen weisen auf einen EB1-abhängigen Checkpoint der Zellteilung hin, welcher die Ausbildung des Spindelapparates kontrolliert. Ein Knockdown von EB1 oder APC in HeLa-Zellen führt allerdings nicht zur Aktivierung des Spindelcheckpoints, trotz der entstehenden Aneuploidien während der Mitose (Draviam et al., 2006).

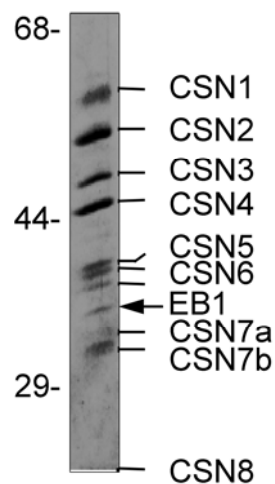
Dynein-Mutanten in *S. cerevisiae* richten während der Mitose den Spindelapparat häufig falsch aus, was zu einer Verzögerung des Eintritts in die Anaphase führt. Eine Deletion des EB1-Homologs in *S. cerevisiae* hebt diese Verzögerung im Zellzyklus der Dynein-Mutanten auf. Dies führt zur Knospung von Tochterzellen, die keinen Kern enthalten (Muhua et al, 1998). Die Deletion von *mal3* in *S. pombe* führt zu einer Verlängerung der Mitose. Eine Kompromittierung des mitotischen Checkpoints in

*mal3*-Mutanten führt zu Chromosomen-Missegregationen während der Mitose (Asakawa und Toda, 2006; Asakawa et al., 2005).

Ähnliche Beobachtungen können auch in siRNA-Studien (short interference RNA) an *D. melanogaster*-Zelllinien gemacht werden. Derartig behandelte Zellen zeigen keinen Phänotyp bei reduzierter EB1-Proteinmenge während der Interphase. Die Mikrotubuli befinden sich im Gegensatz zu der Kontrolle in einem pausierten Zustand, in welchem weder eine Polymerisierung noch eine Depolymerisierung stattfindet. Im Verlauf der Mitose bilden EB1-depletierte Zellen keine oder nur sehr kurze Astralspindeln in der Metaphase aus. Dies hat eine Verzögerung der Transition von der Metaphase zur Anaphase zur Folge (Rogers et al., 2002). Ähnliche Defekte bei der Ausbildung der Astralspindeln und der Cytokinese können bei einer Inhibition der Interaktion von EB1 mit p150<sup>Glued</sup> beobachtet werden (Strickland et al., 2005).

#### 1.4. Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten CSN-Untereinheiten mittels siRNA herunterreguliert werden. Dabei sollten die Effekte der verschiedenen Untereinheiten auf die Zusammensetzung des CSN-Komplexes, sowie auf die Proteolyse von Substraten durch das UPS untersucht werden. Neben den bereits bekannten und charakterisierten Substraten, deren Abbau durch das CSN reguliert wird, sollte der Abbau von EB1 studiert werden.



**Abb. 11: Ko-Aufreinigung von EB1 mit dem CSN**

Das CSN wurde aus Erythrozyten aufgereinigt und mittels SDS-Page aufgetrennt. Die nach der Coomassie-Färbung sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie analysiert. Es konnten alle CSN-Untereinheiten nachgewiesen werden, sowie das EB1-Protein (Abb. modifiziert nach Zhou et al., 2003).

EB1 wurde bei der systematischen Analyse des aufgereinigten CSN mittels Massenspektrometrie identifiziert (siehe Abb. 11). In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion von EB1 mit dem CSN genauer charakterisiert werden. Der Focus der Untersuchungen lag auf dem Abbau von EB1 und wie dieser durch das CSN reguliert wird. Dabei war der Effekt von möglichen Phosphorylierungen von EB1 durch die CSN-assoziierten Kinasen von Interesse. *In vivo* sollte der direkte Effekt des CSN auf die Proteolyse von EB1 in den siRNA-Zelllinien untersucht werden. Da EB1 die Polymerisierung von Mikrotubuli reguliert, wurden funktionelle Zusammenhänge zwischen EB1, dem CSN und Mikrotubulifilamenten studiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer (horizontal)	Renner GmbH
Bilddokumentation	UV-Systeme, Intas
Elektroporator	EasyjecT Optima, Flowgen Bioscience Ltd
FACS-Gerät	FACSCalibur, BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMR
FPLC	GE Healthcare
Fluoreszenzplattenreader	FluoStar Reader, Tecan
Nativgelsystem	Phast System, GE Healthcare
PCR-Cycler	Tpersonal, Biometra
Photometer	Ultrospec 1000, GE Healthcare
SDS-PAGE-System	Mini Protean 3Cell, Bio-Rad Laboratories
Ultraschallgerät	Sonoplus GM70, Bandelin Electronic
Ultrazentrifugen + Rotoren	L7-55 und L-70, Beckmann Coulter Rotoren: SW 28 und SW 40
Western-Blot-System	Mini Trans-Blot Electrophoretic System, Bio-Rad Laboratories
Zellkulturbrutschrank	HERAcell, Kendro Laboratory Products
Zentrifugen + Rotoren	Biofuge Fresco, Megafuge 1.0R und Biofuge 15R, Kendro Laboratory Products J2-21, J2-HS und Avanti J-25, Beckmann Coulter Rotoren: JA10, JA14, JA20, JA 25.50

#### 2.1.2. Chemikalien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich
APS	Sigma-Aldrich
ATP	Roth
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	GE Healthcare
Curcumin	Roth
DAPI	MP Biomedicals
Ethidiumbromid	Roche
Imidazol	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kreatinphosphokinase	Sigma-Aldrich
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich
MG132	Biomol
Neomycin	Sigma-Aldrich
Nocodazol	AppliChem
Lipofectamin 2000	Invitrogen

[ <sup>32</sup> P]Orthophosphat	GE Healthcare
Penicillin/Streptomycin	Gibco
PMSF	Roth
Polyacrylamid: Rotiphorese Gel 30	Roth
Propidiumjodid	AppliChem
Protease Inhibitor: Protease inhibitor cocktail complete, EDTA-free	Roche
Puromycin	AppliChem
SDS	Serva
Streptomycin	Gibco
Suc-LLVY-AMC	Bachem
Temed	Roth
Tryptanblau	Roche
Trypton	Difco
X-Gal	Stratagene

Alle weiteren gängigen Chemikalien wurden von AppliChem und Merck bezogen.

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterial**

Material	Hersteller
Acrylküvetten	Sarstedt
Dialysemembran: MWCO 6-8000	Spectrum Europe
DNA Größenstandard: 1kb DNA-Ladder	Invitrogen
Elektroporationsküvetten	PEQLAB
Filme: X-Omat UV Film und Biomax MR	Kodak
Filterpapier: GB002 Gel-blotting-paper	Schleicher & Schuell
Filterzentrifugationseinheit: Amicon Ultra 10000 MWCO	Millipore
Gradientengel 4-15% und Native Buffer Strips	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Ni-NTA-Magnetagarose	Qiagen
Nirocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One
Plastikpipetten	Sarstedt
ProteinG-Sepharose	GE Healthcare
Protein Größenstandard: High-Range Rainbow <sup>TM</sup> Molecular Weight Marker	GE Healthcare
SDS-Ladepuffer: Roti-Load 1	Roth
ToyoPearls	Tosoh-Haas
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen**

Puffer	Zusammensetzung
10x AB-Puffer	300 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,8
Bindungspuffer10	20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Bindungspuffer20	20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Blockmilch	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol, pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
5x DNA-Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,4% (w/v) Xylen-Orange G in 1xTAE
Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol
Lysepuffer	40 mM Tris/HCl, 0,2% (v/v) NP-40, 2 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
Mono-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1mM EDTA, pH 7,4
1x PBS	135 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
PBST	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween-20
Ponceau S-Färbelösung	0,2% (w/v) Ponceau S in 5% (w/v) TCA
PufferA5	20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 5% (v/v) Glycerol, 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
PufferA50	20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
PufferA40	20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 40% (v/v) Glycerol, 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
PufferB400	20 mM Tris/HCl, 400 mM KCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
PufferB1000	20 mM Tris/HCl, 1 M KCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Strippingpuffer	62,5 mM Tris/HCl, 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, pH 6,7
TAE	40 mM Tris, 2 mM EDTA auf pH 8,5 mit Essigsäure eingestellt
TFB1	10 mM $\text{CaCl}_2$ , 15 (v/v) Glycerol, 30 mM KAc, 100 mM RbCl, 50 mM $\text{MnCl}_2$ , pH 5,8
TFB2	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $\text{CaCl}_2$ , 15% (v/v) Glycerol, pH 7,0
Triple-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) NP-40, 0,02% (w/v) Natriumazid, pH 7,4

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt, die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

### 2.1.5. Enzyme und Kits

**Tabelle 5: Enzyme und Kits**

Enzyme/Kits	Hersteller
CK2	Merck
dNTPs	Invitex
ECL <sup>TM</sup> western blotting detection reagent	GE Healthcare
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit II	Invitex
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNAseA	Roche
PKD	Merck
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
TA cloning Kit	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Roche

### 2.1.6. Antikörper

**Tabelle 6: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper**

Antikörper	Herkunft/Verdünnung/Hersteller
Anti-20S	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Biomol
Anti- $\alpha$ 6	Maus, monoklonal, WB 1:2000, C. Hendil
Anti- $\beta$ -Tubulin	Maus, monoklonal, WB 1:10000, IF 1:500, Covance
Anti-c-Jun	Kaninchen, monoklonal, WB 1:2000, Upstate
Anti-CSN1	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Biomol
Anti-CSN2	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000
Anti-CSN3	Kaninchen, polyklonal, WB 1:5000, IF 1:100
Anti-CSN5	Kaninchen, polyklonal, WB 1:5000, IF 1:100, B. Christy
Anti-CSN7a	Kaninchen, polyklonal, IP: 5 $\mu$ l
Anti-CSN8	Kaninchen, polyklonal, WB 1:3000, Biomol
Anti-Cul1	Maus, monoklonal, WB 1:200, Santa-Cruz
Anti-Cul3	Maus, monoklonal, WB 1: 1000, BD Biosciences
Anti-Cul4	Kaninchen, polyklonal, WB 1:200, Santa-Cruz
Anti-EB1	Kaninchen, polyklonal, WB 1:200, IF 1:100, Santa-Cruz
Anti-EB1	Ziege, polyklonal; IF 1:100, Santa-Cruz
Anti-Flag	Maus, monoklonal, WB 1:2000, Sigma
Anti- $\gamma$ -Tubulin	Maus, monoklonal, IF 1:100, Santa-Cruz
Anti-GST	Kaninchen, polyklonal, WB 1:1000, Santa-Cruz
Anti-His <sub>6</sub>	Kaninchen, polyklonal, WB 1:200, Santa-Cruz
Anti-Rbx1	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Zymed Laboratories Inc.
Anti-RPN2	Maus, monoklonal, WB 1:3000, C. Hendil

Anti-RPT6	Maus, monoklonal, WB 1:2000, Biomol
Anti-RGS-His	Maus, monoklonal, WB 1:1000, Qiagen
Anti-Xpress	Maus, monoklonal, WB 1:5000, Invitrogen
Anti-Maus-POD	Schaf, WB 1:2000, Seramun
Anti-Kaninchen-POD	Schaf, WB 1:2000, Seramun
Anti-Maus-FITC	Ziege, IF 1:100, AL Immunotools
Anti-Kaninchen-Cy2	Ziege, IF 1:100, Jackson Immunoresearch
Anti-Kaninchen-Cy3	Ziege, IF 1:100, Jackson Immunoresearch
Anti-Maus-Cy2	Ziege, IF 1:100, Jackson Immunoresearch
Anti-Maus-Cy3	Ziege, IF 1:100, Jackson Immunoresearch
Anti-Ziege-Cy2	Esel, IF 1:100, Jackson Immunoresearch
Anti-Ziege-Cy3	Esel, IF 1:100, Jackson Immunoresearch

### 2.1.7. Oligonukleotide

**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide für PCRs und siRNA-Konstrukte**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
EB1 Bam 5	GGATTCATGGCAGTGAACGT ATACCTA	5' Oligonukleotid für die Klonierung von EB1 mit BamHI Schnittstelle
EB1 Bam 5 F	GGATTCGCATGGCAGTGAA CGTATACCTA	5' Oligonukleotid für die Klonierung von EB1 mit BamHI Schnittstelle
EB1 Xho 3	CTCGAGTTAATACTCTTCTT GCTCCTC	3' Oligonukleotid für die Klonierung von EB1 mit XhoI Schnittstelle
EB1 121 5	GGAAAAGACTATGACCCTGT G	5' Oligonukleotid für die Klonierung von EB1 $\Delta$ N
EB1 T205V5	GTATTGAAACTTGTTGTTGA AGACTTG	5' Oligonukleotid für die Mutagenese von EB1 T205 zu V
EB1 T205V3	CAAGTCTTCAACAACAAGTT TCAATAC	3' Oligonukleotid für die Mutagenese von EB1 T205 zu V
EB1 I224A5	TTCGGAAAGCTACGGAACG CTGAATTGATTTGCCAGGAG	5' Oligonukleotid für die Mutagenese von EB1 I224 zu A
EB1 I224A3	AAGCCTTTCGATGCCTTGCG ACTTAACTAAACGGTCCTC	3' Oligonukleotid für die Mutagenese von EB1 I224 zu A
CSN5	CTTTCTGGGATTAATGTTAG	5' Oligonukleotid für die
D151N5	TACTCAG	Mutagenese von CSN5 D151 zu N
CSN5	CTGAGTACTAACATTAATCC	3' Oligonukleotid für die
D151N3	CAGAAAG	Mutagenese von CSN5 D151 zu N
siCSN1s	GATCCCCGAACCTTTAACGT GGACATTTCAAGAGAATGTC CACGTTAAAGGTTCTTTTAA	5' Oligonukleotid zur Expression der CSN1-siRNA in dem pSuper.Retro.Puro-Vektor
siCSN1a	AGCTTAAAAAGAACCTTTAA CGTGGACATTCTCTTGAAAT GTCCACGTTAAAGGTTTCGGG	3' Oligonukleotid zur Expression der CSN1-siRNA in dem pSuper.Retro.Puro-Vektor
siCSN3s	GATCCCCGAAGATGATTCAG GAAACATTCAAGAGATGTTT CCTGAATCATCTTCTTTTAA	5' Oligonukleotid zur Expression der CSN3-siRNA in dem pSuper.Retro.Puro-Vektor
siCSN3a	AGCTTAAAAAGAGATGATT CAGGAAACATCTCTTGAATG TTTCCTGAATCATCTTCGGG	3' Oligonukleotid zur Expression der CSN3-siRNA in dem pSuper.Retro.Puro-Vektor



Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex bezogen.

### 2.1.8. Vektoren

**Tabelle 8: Verwendete Vektoren zur Klonierung und Expression von cDNAs**

Vektor	Hersteller
pCDNA3.1Flag	Michael Naumann, Magdeburg
pCDNA3.1HisA, B, C	Invitrogen
pCR2.1	Invitrogen
pEGFP	BD Biosciences
pGEX4T3	GE Healthcare
pQE3x	Qiagen
pSuper.Retro.Puro	Oligoengine

### 2.1.9. Medien

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Medien für *Escherichia coli***

Medium	Zusammensetzung/Hersteller
LB-Medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 20 mM Glucose

Als Antibiotika für das Wachstum von *E. coli* wurden Ampicillin und Kanamycin in den Endkonzentration von 100 µg/ml bzw. 25 µg/ml verwendet.

### 2.1.10. *Escherichia coli* Stämme

**Tabelle 10: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm	Hersteller
DH5α	Invitrogen
INVaF'	Invitrogen
M15 [pREP4]	Qiagen
SG13009 [pREP4]	Qiagen

### 2.1.11. Eukaryotische Zelllinien

Für Experimente mit humanen Zellen wurde die adhärente Cervixkarzinomzelllinie HeLa (DSMZ) verwendet.

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Protokoll angesetzt und in einem PCR-Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Dieser wurde vor Beginn der PCR auf 105 °C vorgeheizt.

**Tabelle 11: Standard PCR-Ansatz**

Komponente	Endkonzentration
10x Taq DNA-Polymerase Puffer mit Magnesium	1x
Oligonukleotid 1	0,5 µM
Oligonukleotid 2	0,5 µM
dNTPs	200 µM pro dNTP
Taq DNA-Polymerase	1 U/50 µl
DNA Vorlage: HeLa cDNA-Bank	1x10 <sup>8</sup> PFU
Plasmid-DNA	1-10 ng

Die Programmierung des PCR-Cyclers war für das jeweilige PCR-Produkt spezifisch, da sich die Anlagerungstemperatur  $T_a$  der Oligonukleotide, sowie die Länge der zu amplifizierenden DNA unterschieden. Für die Taq DNA-Polymerase wurde eine Polymerisierungsrate von 1 kb/min angenommen. Als Ausgangsmaterial für die DNA-Vorlage wurde eine HeLa cDNA-Bank oder gereinigte Plasmid-DNA verwendet. Generell wurde folgendes Schema zur Programmierung verwendet:

**Tabelle 12: Standard PCR-Programm**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	
1	95	5	
2	95	1	
3	$T_a$	1	X Zyklen (Schritt 2-5)
4	72	X	
5	72	7	
6	4	∞	

### **2.2.2. Ortsspezifische Mutagenese**

Die zielgerichtete Mutation einer DNA-Sequenz wurde mittels PCR unter der Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase durchgeführt. Dazu wurde das PCR-Schema von 2.2.1 so angepasst, dass anstelle der *Taq* DNA-Polymerase die *Pfu* DNA-Polymerase (0,1 U/µl) mit dem jeweiligen Puffer eingesetzt wurde. Die Polymerisierungsreaktion der *Pfu* DNA-Polymerase erfolgte bei 68 °C, wobei eine Polymerisierungsrate von 500 bp/min zur Berechnung der Elongationsdauer angenommen wurde. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und mittels 0,4 U/µl DpnI eine bis zwei Stunden lang bei 37 °C verdaut und anschließend in *E. coli* transformiert.

### **2.2.3. Agarosegelelektrophorese**

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der Größe wurden 0,5 – 2% (w/v) Agarosegele verwendet. Diese wurden mit Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und elektrophoretisch bei 10 V/cm aufgetrennt. Als DNA-Größenstandard diente die 1 kb-Ladder (Invitrogen).

### **2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der Banden unter UV-Licht von 320 nm Wellenlänge. Zur Aufreinigung der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken diente das entsprechende Kit von GE-Healthcare, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde.

### **2.2.5. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten**

Für das Schneiden von DNA wurden 1 - 2 µg DNA mit 1 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 µl versetzt. Der Verdau erfolgte in dem für das jeweilige Enzym mitgelieferten Puffer und in Anwesenheit von 10 µg/ml BSA bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Für den gleichzeitigen Verdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde der Reaktionspuffer nach den Angaben des Herstellers ausgewählt. Das eingesetzte Volumen an Restriktionsenzymen durfte nicht mehr als 10% (v/v) des Reaktionsansatzes überschreiten.

### **2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmente wurden mittels T4 DNA-Ligase wieder miteinander verknüpft. Dazu wurden 400 U T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Die Verhältnisse von Vektor zu Insert variierten von 1:1 bis 1:5. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. PCR-Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor nach Angaben des Herstellers ligiert.

### **2.2.7. Transformation von *Escherichia coli***

#### **2.2.7.1. Herstellung von chemokompetenten Bakterien**

Eine Übernacht-Kultur des *E. coli* Stammes DH5α wurde 1:100 in 100 ml LB Medium verdünnt. Bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C wurde die Kultur unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 6000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TBF1 resuspendiert und nach 15 min Inkubation auf Eis wieder pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TBF2 gelöst und in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### **2.2.7.2. Herstellung von elektrokompetenten Bakterien**

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme M15 und SG13009 wurden 1:100 in 250 ml kanamycinhaltigem Medium verdünnt und unter Schütteln bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 6000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut pelletiert. Nach wiederholtem Waschen mit 125 ml ddH<sub>2</sub>O wurden die Zellen in 10% (v/v) Glycerol aufgenommen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 1,5 ml 10% (v/v) Glycerol resuspendiert. Hiervon wurden Aliquots zu je 55 µl bei -80 °C eingefroren.

#### **2.2.7.3. Transformation durch Hitzeschock**

Die chemokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 15 min mit 10 µl des Ligationsansatzes inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Bevor die

Bakterien auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert wurden, erfolgte eine 60 minütige Inkubation bei 37 °C in 500 µl SOC-Medium.

#### **2.2.7.4. Transformation durch Elektroporation**

Die elektrokompenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationskuvette inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 335 Ω, 15 µF und 2,5 kV/cm. Die Bakterien wurden unmittelbar danach mit 1 ml SOC-Medium versetzt und nach einer Stunde bei 37 °C auf LB-Agar Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert.

#### **2.2.8. Plasmidpräparation**

##### **2.2.8.1. Plasmidpräparation mit Phenol/Chloroform**

Von einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 0,5 ml 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und eine Minute kräftig vermischt. Dann wurde 5 Minuten bei 14000 g abzentrifugiert und die obere Phase mit einem Volumen Isopropanol zur Fällung der DNA versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 14000 g für fünf Minuten pelletiert und anschließend einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

##### **2.2.8.2. Mini-Präp mittels Alkalischer Lyse**

Für die Plasmidpräparation mittels der Alkalischen Lyse wurde das Plasmid Mini Kit II von Invitex gemäß Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

##### **2.2.8.3. Maxi-Präp**

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurden Maxi-Präps von Plasmiden mittels des EndoFree Plasmid Maxi Kits von Qiagen durchgeführt. Die Präparation der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 1,2 ml 1x PBS aufgenommen und in Aliquots zu 200 µl bei -20 °C gelagert.

## **2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1. Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde das pQE3x-System von Qiagen für His<sub>6</sub>-markierte Proteine verwendet. Dabei wurden die von Qiagen empfohlenen Bedingungen für die Aufreinigung unter nativen oder denaturierenden Bedingungen befolgt. Für GST-markierte Proteine wurde der pGEX4T3-Vektor von GE-Healthcare verwendet, die Aufreinigung erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben. Die so gewonnen Proteine wurden bei der nativen Aufreinigung gegen 1x PBS umgepuffert und bei der denaturierenden Aufreinigung schrittweise gegen 1x PBS dialysiert. Dazu wurde ausgehend von 4 M Harnstoff in 1x PBS, in Schritten mit jeweils um 0,5 M absteigender Harnstoffkonzentration, gegen 1x PBS dialysiert.

### **2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurden mit Variationen nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurde das Biorad Mini Protean III System verwendet, um die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach dem Molekulargewicht aufzutrennen. Je nach Größe des Proteins wurden Trenngele von 7,5% (w/v) bis 15% (w/v) Polyacrylamid verwendet. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels erfolgte nach folgendem Schema:

Sammelgel: 0,75 ml Tris/HCl pH 6,8, 0,5 ml 30% (w/v) Acrylamidlösung, 1,7 ml dH<sub>2</sub>O, 30 µl 10% (w/v) SDS, 15 µl 10% (w/v) APS, 3 µl TEMED

Trenngel: 2,5 ml Tris/HCl pH 8,8, x ml 30% (w/v) Acrylamidlösung, 100 µl 10% (w/v) SDS, 100 µl 10% (w/v) APS, 10 µl TEMED, ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

Aufzutrennende Proteine wurden mit SDS-Ladepuffer für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 160 V für eine Stunde.

### 2.3.3. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Zur nativen, nicht-denaturierenden Auftrennung von Proteinen wurde das PhastSystem von GE-Healthcare verwendet. Die Proteine wurden in vorgefertigten 4 – 15% Gradientengelen unter Verwendung von Nativ-Gel-Laufpuffer aufgetrennt. Die Programmierung des PhastSystems erfolgte nach folgendem Schema:

10 Vh	400 V	10 mA	2,5 W	10 °C
2 Vh	400 V	1 mA	2,5 W	10 °C
150 Vh	400 V	10 mA	2,5 W	10 °C
250 Vh	10 V	0,1 mA	1 W	10 °C

Die Auftragung der Proben erfolgte im zweiten Schritt.

### 2.3.4. Coomassie-Färbung

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine mit der Coomassie-Färbelösung angefärbt. Nach 20-30 Minuten wurde die Färbelösung abgegossen und die unspezifisch im Gel gebundene Farbe durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung entfernt. Die Gele wurden anschließend für 90 Minuten bei 80 °C auf Filterpapier getrocknet.

### 2.3.5. Western-Blot und Immunodetektion

Die über SDS-PAGE oder Nativ-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Dazu wurde das BioRad Mini Trans-Blot Electrophoretic System verwendet. Gel und Membran wurden zwischen zwei Lagen Filterpapier eingespannt. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer bei 250 mA für zwei Stunden. Die Übertragung der Proteine wurde mittels Ponceau S-Färbung (2.3.6) überprüft. Vor der Immunodetektion wurde die Membran eine Stunde mit Blockmilch blockiert. Die Detektion von Proteinen mittels Antikörper erfolgte anschließend durch eine zweistündige Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in Blockmilch oder 1x PBS verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen für fünf Minuten mit PBST wurde der Sekundärantikörper für zwei Stunden aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mittels der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase nach weiterem viermaligem Waschen. Signale wurden mittels X-Omat UV-Filmen nach Inkubation

der Membran mit ECL-Lösung dokumentiert, welche entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde.

### **2.3.6. Ponceau S-Färbung**

Auf Nitrocellulosemembranen transferierte Proteine wurden mittels Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Die unspezifisch gebundene Farbe wurde nach dem Abgießen der Färbelösung durch mehrmaliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O entfernt.

### **2.3.7. TCA-Fällung**

Proteine wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die Proben mit einer Endkonzentration von 10% (w/v) TCA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C wurde das Pellet einmal mit 0,5 ml 5% (w/v) TCA und zweimal mit 1 ml Aceton gewaschen. Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

### **2.3.8. *In vitro*-Bindungsstudien**

#### **2.3.8.1. GST-Pulldown**

Fünf µg des GST-markierten Proteins wurden mit 10 µg des zu testenden Interaktionspartners in 300 mM NaCl für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das GST-markierte Protein eine Stunde lang bei 37 °C an GSH-Agarose gebunden. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Mit 10 mM reduziertem Glutathion wurden spezifisch gebundene Proteine eluiert. Als Kontrollprotein wurde rekombinant hergestellte GST verwendet.

#### **2.3.8.2. Ni-NTA-Pulldown**

Es wurden 5 µg der His<sub>6</sub>-markierten Proteins mit 10 µg des potentiellen Interaktionspartners in Bindungspuffer<sup>10</sup> für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Präzipitation des His<sub>6</sub>-markierten Proteins erfolgte eine Stunde nach Zugabe von 25 µl Ni-NTA Agarose. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Bindungspuffer<sup>20</sup> entfernt. Das Präzipitat wurde danach in 1x SDS-Laufpuffer aufgenommen.



### **2.3.9. *In vitro*-Kinaseassay**

Phosphorylierungen wurden *in vitro* mit den rekombinanten Kinasen CK2 (25 U), PKD (21 ng) und dem aufgereinigtem CSN-Komplex (1 µg) durchgeführt. Dazu wurde 1 µg des zu phosphorylierenden Proteins in Gegenwart der Kinasen für eine Stunde bei 37 °C mit 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer gestoppt und das Reaktionsgemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Coomassie Färbung wurde das getrocknete Gel auf Biomax MR-Filmen exponiert, um die Autoradiographie zu detektieren.

### **2.3.10. *In vitro*-Degradationsassay**

Als Quelle des UPS wurden  $2,5 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Ansatz zunächst in Monolysispuffer lysiert. Ein ATP-regenerierendes System wurde durch die Zugabe von 5 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat und 0,6 U Kreatin Kinase pro Ansatz aufgebaut. Zusätzlich wurden 6 µg Ubiquitin in den Ansatz gegeben. Die Hemmstoffe Curcumin und MG132 wurden mit den Endkonzentrationen von 50 µM bzw. 10 µM eingesetzt. Der Abbau von 0,5 µg EB1 wurde über acht Stunden bei 37 °C verfolgt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und sofort aufgekocht. Die Proben wurden danach über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

### **2.3.11. Präparation des CSN**

#### **2.3.11.1. Lyse der Erythrozyten**

Die Präparation des CSN-Komplexes erfolgte aus humanen Erythrozyten. Als Ausgangsmaterial dienten zwei überlagerte Erythrozyten-Konzentrate. Diese wurden dreimal mit einem Volumen 1x PBS gewaschen. Durch Zentrifugation bei 4000 g für zehn Minuten wurden die Zellen pelletiert und der Überstand entfernt. Durch Zugabe von zwei Volumen Lysepuffer wurden die Zellen eine Stunde unter Rühren lysiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren bei 16000 g für 60 Minuten und anschließend nochmals für weitere 30 Minuten von Zelltrümmern abgetrennt.

#### **2.3.11.2. DEAE-Ionenaustauscher**

DEAE-ToyoPearls wurden vor der Verwendung einmal mit PufferA50, einmal mit PufferB1000 und zweimal mit PufferA10 gewaschen. Das Lysat der Erythrozyten

wird mit 30 ml DEAE-Säulenmaterial über Nacht rollend inkubiert. Das Säulenmaterial wurde nach dem Absaugen des Überstandes in eine X25-Säule (GE Healthcare) gegeben. Die Säule wurde dann mit drei Volumen PufferA50 bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von 50 bis 400 mM KCl. Dabei wurden 65 Fraktionen zu je 3,5 ml gesammelt. Das Säulenmaterial kann nach Waschen mit einmal PufferB1000 und dreimal mit PufferA50 wieder verwendet werden. Die Fraktionen werden mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht.

#### **2.3.11.3. Ammoniumsulfatfällung**

Die von der DEAE gewonnen Fraktionen wurden zur Auftragung auf einen Glycerolgradient gefällt. Dazu wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 45% Sättigung langsam unter Rühren hinzu gegeben. Die gefällten Proteine wurden bei 13000 g für 30 Minuten abzentrifugiert und in 1,2 ml PufferA5 aufgenommen. Das Ammoniumsulfat wurde durch zweimaliges Dialysieren gegen zwei Liter PufferA5 über Nacht entfernt.

#### **2.3.11.4. Dichtegradientenzentrifugation I**

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Dichtegradienten. Dazu wurden lineare Gradienten von 10 - 40% (v/v) Glycerol gegossen. Diese wurden mit maximal 40 mg Protein in 1,5 ml Probenvolumen beladen für 25 Stunden bei 25000 rpm in einem SW28-Rotor zentrifugiert. Das Ernten der Gradienten erfolgte von unten nach oben in 20 Fraktionen bei einer Erntegeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht.

#### **2.3.11.5. FPLC: MonoQ-Säule**

Die vereinigten Fraktionen des Glycerolgradienten wurden mittels Superloop auf eine MonoQ-Säule (GE-Healthcare) aufgetragen. Das Laden der Säule erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Proben wurden auf der Säule über einen Gradienten von 145 - 430 mM KCl (0-40% PufferB1000) bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min aufgetrennt. Anhand des Elutionsprofils wurden die Fraktionen für SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ausgewählt.

#### **2.3.11.6. Dichtegradientenzentrifugation II**

Die Lagerung des CSN erfolgte durch versetzen mit Glycerol. Dazu wurden die Fraktionen der FPLC auf ungefähr 500 µl mittels Filterzentrifugation konzentriert und gegen PufferA50 umgepuffert. Die Proben wurden dann wie in 2.3.11.4 weiter behandelt. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW40-Rotor bei 25000 rpm für 25 Stunden. Der Gradient wurde von unten nach oben geerntet in 20 Fraktionen zu 620 µl. Die abschließende Überprüfung der Präparation erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von ausgewählten Fraktionen des Gradienten.

### **2.4. Zellkultur**

#### **2.4.1. Kultivierung**

HeLa-Zellen wurden in RPMI1640 Medium (Biochrom) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom) kultiviert. Dabei wurden die Zellen im Brutschrank in gesättigtem Wasserdampf bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

#### **2.4.2. Lyse von HeLa-Zellen**

Die Zellen wurden vor der Lyse mit 1x PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Zur Lyse wurde Mono- oder Triplelysepuffer mit Roche-Proteaseinhibitor verwendet. Zelltrümmer wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde direkt für Native-PAGE verwendet oder mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und aufgekocht.

#### **2.4.3. Cycloheximid-Versuche**

Der Abbau von Proteinen in Zellkulturlinien wurde mittels Cycloheximid-Versuchen bestimmt. Dazu wurden die Zellen für den gewünschten Zeitraum mit 20 µg/ml Cycloheximid in RPMI1640 Medium behandelt. Für Zeitreihen wurde die Behandlung der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestartet, um die Zellen der unterschiedlichen Zeitpunkte gleichzeitig zu lysieren.

#### **2.4.4. Transiente Transfektion**

HeLa-Zellen wurden mittels Lipofectamin2000 (Invitrogen) transfiziert. Dazu wurden die Zellen am Vortag ausgesät und nach Herstellerangaben mit einem DNA:Lipofectamin Verhältnis von 1:2 in Optimem (Gibco) transfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen RPMI1640 gewechselt. Die Lyse der Zellen erfolgte 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion.

#### **2.4.5. Stabile Transfektion**

Um stabil transfizierte Zellen herzustellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 10 µg DNA transfiziert. Die Selektion von Transfektanten erfolgte zwei Tage nach Transfektion. Dazu wurden die Zellen in Verdünnungsreihen zu  $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  Zellen in 96-Well Platten ausgesät. Die Selektion mit Puromycin erfolgte mit 5 µg/ml über zwei Tage. Danach wurde die Dosis auf 1 µg/ml reduziert. Das Antibiotikum G418 wurde zur Selektion in einer Konzentration von 300 µg/ml für drei Wochen eingesetzt. Danach wurde die Dosis auf 30 µg/ml gesenkt. Aus jenen Wells in denen nur eine Zelle überlebt hatte, wurden Zelllinien gewonnen, die für die weiteren Versuche verwendet wurden.

#### **2.4.6. *In vivo*-Phosphomarkierung**

Für die Markierung mit radioaktivem Phosphat wurden  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen verwendet. Diese wurden zuerst mit phosphatfreiem DMEM (Gibco) gewaschen und dann für zwei Stunden in phosphatfreiem DMEM inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 Minuten in DMEM mit 1 mCi/ml [ $^{32}$ P] Orthophosphat inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Triplelysispuffer mit 20 mM NaF und 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  lysiert.

#### **2.4.7. Nocodazol-Behandlung**

Die Synchronisierung von HeLa-Zellen mittels Nocodazol induziertem Zellzyklusarrest wurde durch eine 18-stündige Behandlung mit 300 nM Nocodazol bei 37 °C erreicht. Die Depolymerisierung von Mikrotubulifilamenten zur Untersuchung mittels Immunofluoreszenz erfolgte für zehn Minuten bei 37 °C mit 10 µM Nocodazol.

#### **2.4.8. FACS-Analyse**

Für FACS-Analysen wurden  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen ausgesäht und mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA (Invitrogen) von der Zellkulturschale abgelöst und mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 70% (v/v) Ethanol für zwei Stunden bei 4 °C. Die Zellen wurden mit 0,25 mg/ml RNaseA für zwei Stunden bei 37 °C behandelt. Die Färbung mit 16 µg/ml Propidiumjodid wurde für 15 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden jeweils 10000 Zellen gemessen.

#### **2.4.9. Immunofluoreszenzmikroskopie**

Auf Deckgläsern angezogene HeLa-Zellen wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen und für fünf Minuten mit eiskaltem Methanol:Aceton (1:1) bei Raumtemperatur fixiert. Das Objekt wurde nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für eine Stunde mit filtriertem 0,5% (w/v) BSA blockiert. Danach wurde der in 0,5% (w/v) BSA verdünnte primäre Antikörper für zwei Stunden aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Färbung mit dem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS und einmal mit dH<sub>2</sub>O wurden die Deckgläser mit den Zellen auf Objektträger gelegt, auf die 10 µl Mowiol vorgelegt wurde. Die Präparate wurden für mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Überschüssiges Mowiol wurde mit Ethanol entfernt. Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert. Die Überprüfung der Färbung erfolgte im einem Leica DRM Epifluoreszenzmikroskop mit einem 100x Ölimmersions-Objektiv (PL Fluotar). Die Fluochrome Cy2 und FITC wurden bei 488 nm (Emission 507 nm) angeregt, Cy3 bei 552 nm (Emission 568 nm). Zur Dokumentation wurde eine Hamamatsu C5985 CCD Kamera und die MetaVue Software (Visitron Systems) verwendet. Bei Bedarf wurden die Objekte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (KLSM) weiter untersucht. Dies wurde in Kooperation mit Jan Peter Böttcher am MPI für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen am KLSM wurde mittels des Bildbearbeitungsprogramms Imaris 4.1.1 der Firma Bitplane durchgeführt.

#### **2.4.10. Glycerolgradient von Zelllysaten**

Dichtegradientenzentrifugation von Zelllysaten erfolgte wie in 2.3.11.6 beschrieben. Dazu wurden  $3 \times 10^7$  HeLa-Zellen ausgesäht und mit 500  $\mu$ l Monolysispuffer lysiert. Auf den Gradienten wurde maximal 300  $\mu$ l an Lysat aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 36000 rpm in einem SW40-Rotor für 18 Stunden. Nach dem Ernten des Gradienten wurden die Fraktionen mit TCA präzipitiert und für SDS-PAGE und Western-Blot verwendet.

#### **2.4.11. Flag-Pulldown**

Flag-Pulldowns wurden durchgeführt, indem 15  $\mu$ g DNA von Flag-markiertem EB1 in  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen transfiziert wurde. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2,5 ml Monolysepuffer lysiert und der Überstand auf Säulen mit Anti-Flag-Agarose (Sigma) geladen. Die Vorbereitung und das Waschen der Säulen wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 2,5 ml Flag-Peptid (0,25 mg/ml). Das Eluat wurde mit TCA präzipitiert und für SDS-PAGE verwendet.

#### **2.4.12. Ni-NTA-Pulldown aus Zelllysaten**

Pulldowns von His<sub>6</sub>-markierten Proteinen wurden 24 Stunden nach der Transfektion von  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen mit 15  $\mu$ g DNA durchgeführt. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l Triplelysepuffer mit 10 mM Imidazol lysiert. Das Lysat wurde für 60 Minuten mit 30  $\mu$ l Ni-NTA-Agarose (Qiagen) bei 4 °C auf einem Inkubationsrad versetzt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation für eine Minute bei 14000 g entfernt und das Präzipitat dreimal mit 1x PBS mit 20 mM Imidazol gewaschen. Das Präzipitat wurde in 1xSDS-Ladepuffer aufgenommen und für SDS-PAGE verwendet.

#### **2.4.13. Immunopräzipitation**

Der CSN-Komplex wurde aus  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen präzipitiert. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml Monolysispuffer lysiert. Das Lysat wurde mit 5  $\mu$ l Anti-CSN7-Antikörper bzw. Anti-GST-Antikörper als Negativ-Kontrolle versetzt. Nach vier Stunden wurde dem Lysat 50  $\mu$ l 50% (v/v) ProteinG-Agarose zugegeben und über Nacht inkubiert. Die

Agarose wurde danach drei- bis fünfmal gewaschen und anschließend mit SDS-Probenpuffer aufgekocht.

#### **2.4.14. siRNA-Versuche**

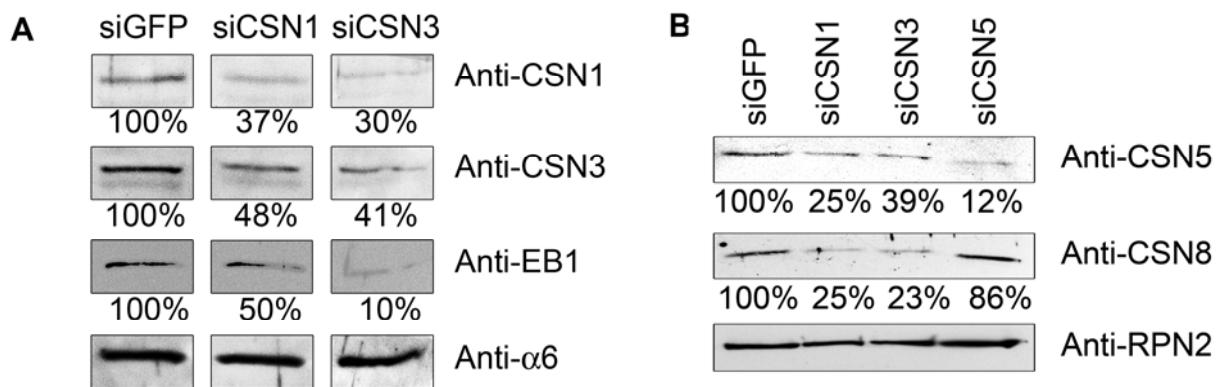
Knockdowns in HeLa-Zellen wurden mit dem pSuper-System durchgeführt (Brummelkamp et al., 2002). Die Zielsequenzen für die siRNAs wurden mit Hilfe der Firma Eurogentech ermittelt. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden zu einem DNA-Doppelstrang angelagert. Dazu wurden diese zuerst in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 100 mM NaCl für vier Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die Anlagerung erfolgte für zehn Minuten bei 70 °C. Die Oligos wurden danach langsam auf 10 °C abgekühlt. Diese wurden dann in den entsprechenden Vektor ligiert und in Zellen transfiziert. Aufgrund der hohen Stabilität der CSN-Untereinheiten wurden stabile Transfektanten hergestellt. Die Evaluation des Knockdowns erfolgte mittels Western-Blot aus Gesamtzelllysaten. Die CSN5-siRNA-Zellen wurden von Wolfgang Henke erstellt und charakterisiert. Für den gegen GFP gerichteten siRNA-Oligo wurde die von Schulze et al. publizierte Sequenz verwendet (Schulze et al., 2005).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. siRNA-Studien von COP9-Signalosom-Untereinheiten

##### 3.1.1. Charakterisierung der siRNA-Zelllinien

Die Funktion des COP9-Signalosom (CSN) sollte in HeLa-Zellen mittels siRNA untersucht werden. Für den Knockdown wurden die Untereinheiten CSN1, CSN3 und CSN5 ausgewählt. Die HeLa-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, welche siRNA-Oligos exprimieren. Die stabil transfizierten Zelllinien wurden siCSN1, siCSN3 und siCSN5 genannt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot charakterisiert (Abb. 12). Als Kontrolle wurde ein gegen GFP gerichteter siRNA-Oligo (siGFP) verwendet (Schulze et al., 2005).



**Abb. 12: Verminderte Expression CSN-Untereinheiten nach Transfektion von siRNA gegen CSN1, CSN3 und CSN5**

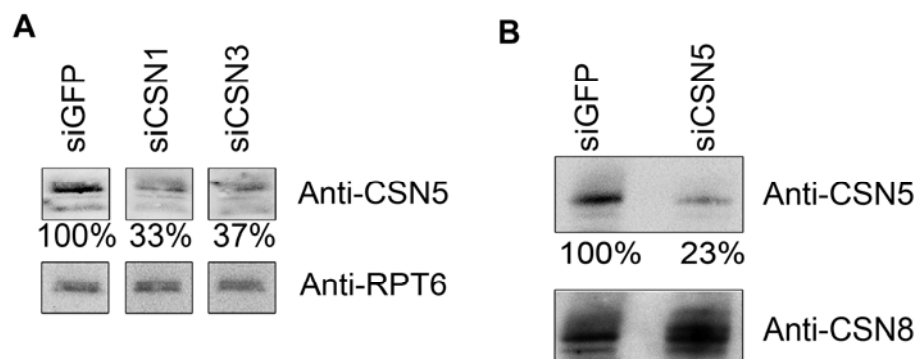
Die Effizienz der einzelnen siRNAs auf die Reduktion von CSN-Untereinheiten wurde im Totallysat analysiert. Dazu wurden die verschiedenen Linien lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf die Reduktion von CSN-Untereinheiten untersucht. In (A) ist der Effekt der CSN1- und CSN3-siRNA gezeigt. Es wurde die Restmenge an CSN1 und CSN3 in den beiden Zelllinien im Vergleich zu siGFP densitometrisch ausgewertet. Die verbleibenden Mengen wurden in Prozent angegeben, wobei die siGFP-Linie als 100% gesetzt wurde. Die proteasomale Untereinheit α6 wurde als Ladekontrolle verwendet. Ebenfalls wurde die Reduktion von EB1 in siCSN1- und siCSN3-Zellen bestimmt. In (B) wurde der Effekt von siCSN5-Zellen in Relation zu siCSN1- und siCSN3-Zellen mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden die Verminderung von CSN5 und CSN8 in allen drei siRNA-Linien im Vergleich zur siGFP-Kontrolle bestimmt. Als Ladekontrolle diente RPN2.

Zur Charakterisierung der Zelllinien wurde zunächst die Reduktion der einzelnen CSN-Untereinheiten bestimmt. Die Effekte der siRNAs in den verschiedenen Zelllinien wurden auf Proteinebene untersucht. Sowohl in siCSN1- und siCSN3-Zellen war die Proteinmenge an CSN1 und CSN3 auf etwa 40% reduziert. In



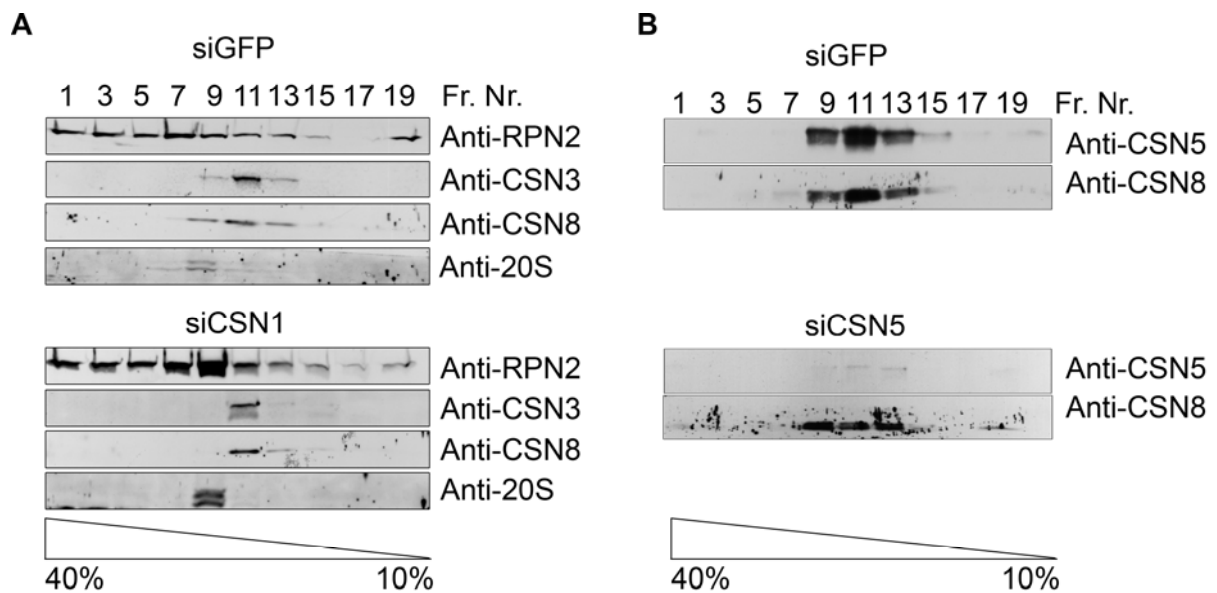
siCSN5-Zellen war nur die Untereinheit CSN5 vermindert, die Expression der restlichen Untereinheiten war jedoch unverändert (Abb. 12 B).

Die weitere Charakterisierung der erstellten CSN-siRNA Zelllinien erfolgte mittels Nativ-PAGE (Abb. 13) und Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 14) von Zelllysaten. Dadurch sollte die Zusammensetzung des CSN-Komplexes in den jeweiligen Zelllinien untersucht werden. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass die Transfektion der CSN1- und CSN3-siRNA eine Reduktion des gesamten CSN-Komplexes zur Folge hatte (Abb. 13 A + 14 A). In den siCSN5-Zellen hingegen war ein Restkomplex vorhanden, der durch die Untereinheit CSN8 im Western-Blot nachgewiesen wurde. Die Menge an CSN5 in diesem Komplex war jedoch deutlich reduziert (Abb. 13 B + 14 B). Es konnten in den Knockdowns keine freien CSN-Untereinheiten oder eventuelle Assemblierungsintermediate des CSN-Komplexes nachgewiesen werden.



**Abb. 13: Charakterisierung des CSN-Komplexes in siCSN1, siCSN3 und siCSN5 Zellen mittels Nativ-PAGE**

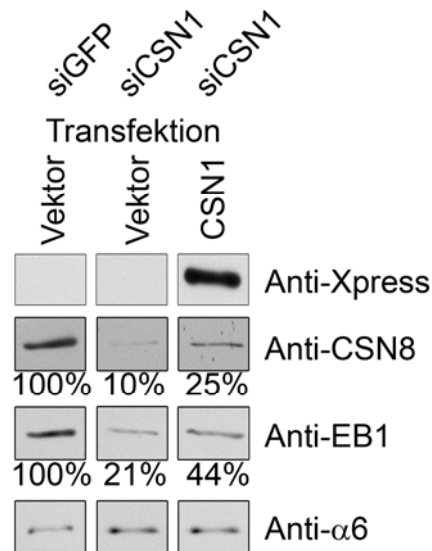
Die Effekte der siRNA-Linien auf den CSN-Komplex wurden im Zelllysate untersucht. Die Lysate wurden über Nativ-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Reduktion des CSN-Komplexes untersucht. Der Komplex in siGFP-, siCSN1- und siCSN3-Zellen wurde mit dem Anti-CSN5-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente die RPT6-Untereinheit des 26S Proteasoms (A). Die Reduktion des CSN wurde prozentual im Verhältnis zur siGFP-Kontrolle berechnet. In siCSN5-Zellen wurde die Zusammensetzung des CSN-Komplexes untersucht (B). Dazu wurde nach Nativ-PAGE und Western-Blot das Verhältnis von CSN5 zu CSN8 in siGFP- und siCSN5-Zellen analysiert.



**Abb. 14: Charakterisierung des CSN-Komplexes in siCSN1-, siCSN3- und siCSN5-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Glycerolgradienten von 10% - 40% wurden verwendet, um die Verteilung des CSN-Komplexes im zellulären Lysat von siGFP- und siCSN1- (A) bzw. siCSN5-Zellen (B) zu untersuchen. Jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen wurden lysiert und das Lysat auf den Gradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 20 Fraktionen geerntet. Die ungeraden Fraktionen wurden mit TCA gefällt und mittels Western-Blot auf CSN-Untereinheiten hin analysiert. In (A) wurde die Verteilung des CSN in Relation zu dem 20S Proteasom und der Proteasomuntereinheit RPN2 untersucht. Dazu wurden Lysate der siGFP- und siCSN1-Zellen verwendet. In (B) ist dies die Verteilung von CSN5 und CSN8 in siGFP- und siCSN5-Zellen abgebildet.

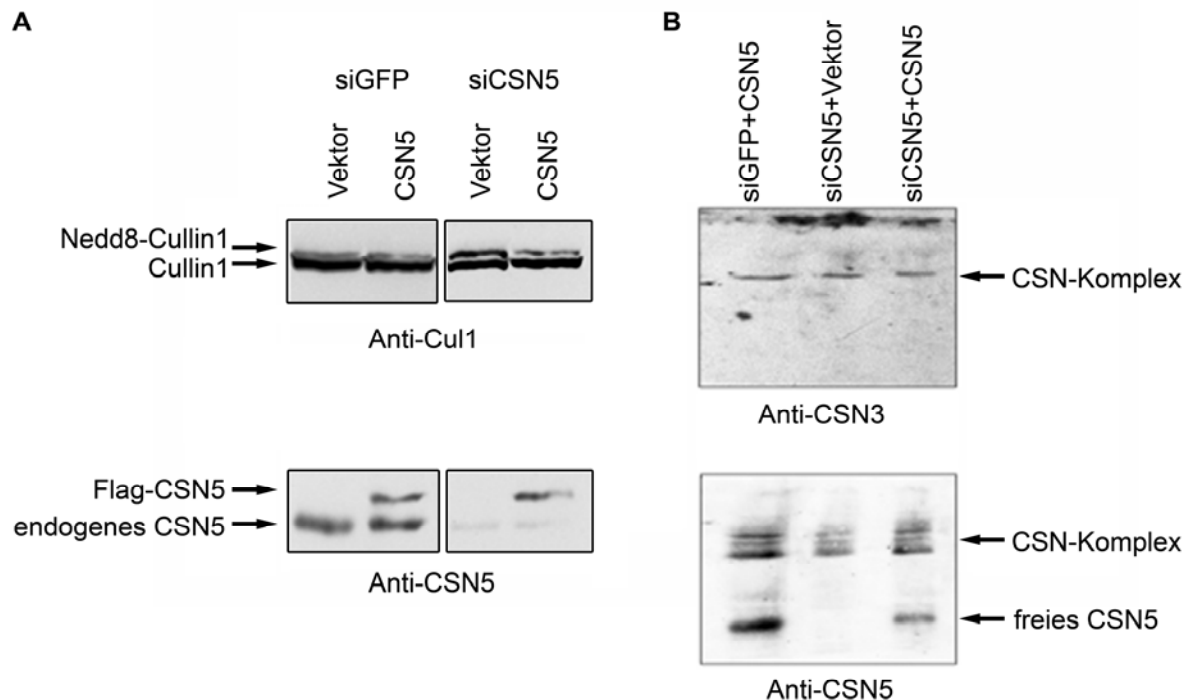
Die Spezifität des CSN-Knockdowns durch den CSN1 siRNA-Oligo wurde mittels einer Überexpression von transfiziertem Xpress-markierten CSN1 kontrolliert (Abb. 15). Ein unspezifischer Effekt der CSN1-siRNA auf die anderen CSN-Untereinheiten würde durch die Transfektion von CSN1 nicht wieder aufgehoben werden. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mittels Western-Blot auf die Mengen an EB1 und CSN8 untersucht. Die Überexpression von CSN1 führte zur Zunahme von CSN8. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten zeigte eine Verdopplung der Menge an CSN8 durch die Transfektion von CSN1. Die Versuchsergebnisse bestätigten die Spezifität der CSN1-siRNA.



**Abb. 15: Die Überexpression von CSN1 in siCSN1-Zellen führt zur Zunahme des CSN und von EB1**

Die siGFP- und siCSN1-Zellen wurden mit einem Vektor ohne Insert, die siCSN1-Zellen außerdem mit Xpress-markierten CSN1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und auf die Zunahme von CSN8 und EB1 mittels Western-Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde die Proteasomuntereinheit  $\alpha 6$  benutzt. Die Mengen von EB1 und CSN8 wurden densitometrisch ausgewertet und in Relation zur siGFP-Kontrolle gesetzt.

Ein entsprechendes Experiment wurde für die siCSN5-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit Flag-CSN5 transfiziert. Der Einbau von CSN5 in den vorhandenen CSN-Restkomplex wurde durch die Wiederherstellung der Deneddylierung von Cullin1 überprüft. Freies, nicht komplexgebundenes CSN5 ist katalytisch inaktiv, weshalb nur durch den Einbau von CSN5 in den CSN-Komplex nach der Transfektion die Deneddylierung durch das CSN wieder erfolgen kann. Dies konnte nach der Transfektion von siCSN5-Zellen mit Flag-CSN5 auch beobachtet werden. (siehe Abb. 16 A). Die Transfektion von Flag-CSN5 in siGFP-Zellen hatte keinen Effekt auf die Neddylierung von Cullin1. Der Einbau von Flag-CSN5 in den CSN-Komplex wurde durch Nativ-PAGE untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen lysiert und der CSN-Komplex auf die Menge an CSN5 und CSN3 untersucht. Die Transfektion von Flag-CSN5 in siGFP-Zellen führte zur Akkumulation von freiem CSN5, in siCSN5-Zellen wurde ein Teil des transfizierten Flag-CSN5 in den CSN-Komplex eingebaut (siehe Abb. 16 B).

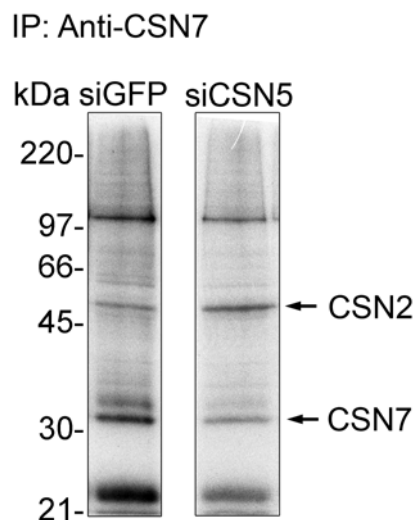


**Abb. 16: Einbau von transfiziertem CSN5 in das CSN von siCSN5-Zellen**

siGFP- und siCSN5-Zellen wurden mit CSN5wt transfiziert. Der Einbau der transfizierten CSN5 in den CSN-Komplex wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot (A) untersucht. Als funktionelles Kriterium für den Einbau diente die Wiederherstellung der Cul1-Deneddylisierung. Dazu wurde ein Anti-Cul1-Antikörper verwendet. Als Kontrolle für die Transfektion wurde ein Anti-CSN5-Antikörper benutzt. Der Einbau von CSN5 wurde ebenfalls mittels Nativ-PAGE untersucht (B). Im Western-Blot wurden Anti-CSN3- und Anti-CSN5-Antikörper verwendet, um die Relation von CSN5 zu CSN3 im Komplex nach der Transfektion von siCSN5-Zellen zu bestimmen.

Der Knockdown von CSN5 beeinflusste die restlichen Untereinheiten nicht, weshalb der verbleibende CSN-Komplex auf seine Aktivitäten untersucht wurde. Für die Deneddylisierung von Cullinen durch das CSN ist die Metalloproteaseaktivität von CSN5 notwendig. Die weiteren Aktivitäten des CSN hingegen werden durch assoziierte Proteine bereitgestellt. Diese könnten weiterhin unabhängig von CSN5 an den Komplex binden. Der CSN-Komplex wurde deshalb in siCSN5-Zellen durch Immunopräzipitationen (IP) weiter charakterisiert. Das CSN aus  $1 \times 10^7$  siGFP- oder siCSN5-Zellen wurde mittels Anti-CSN7-Antikörper präzipitiert (Abb. 17). Der CSN-Komplex wurde dann mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert, um eine Assoziation des Restkomplexes mit Kinasen zu testen. Es konnte nicht genügend CSN-Komplex präzipitiert werden, um die CSN-Untereinheiten mit der Coomassie-Färbung nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Eine Kinaseaktivität war in der Autoradiographie

nachweisbar. Die Größe der Banden entsprach der Autophosphorylierung von CSN2 und CSN7, wie in Uhle et al. (2003) beschrieben. Der Komplex aus siCSN5-Zellen verfügte folglich noch über eine Kinaseaktivität. Eine deubiquitinierende Aktivität des CSN aus siGFP- oder siCSN5-Zellen war nach der Immunopräzipitation nicht mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

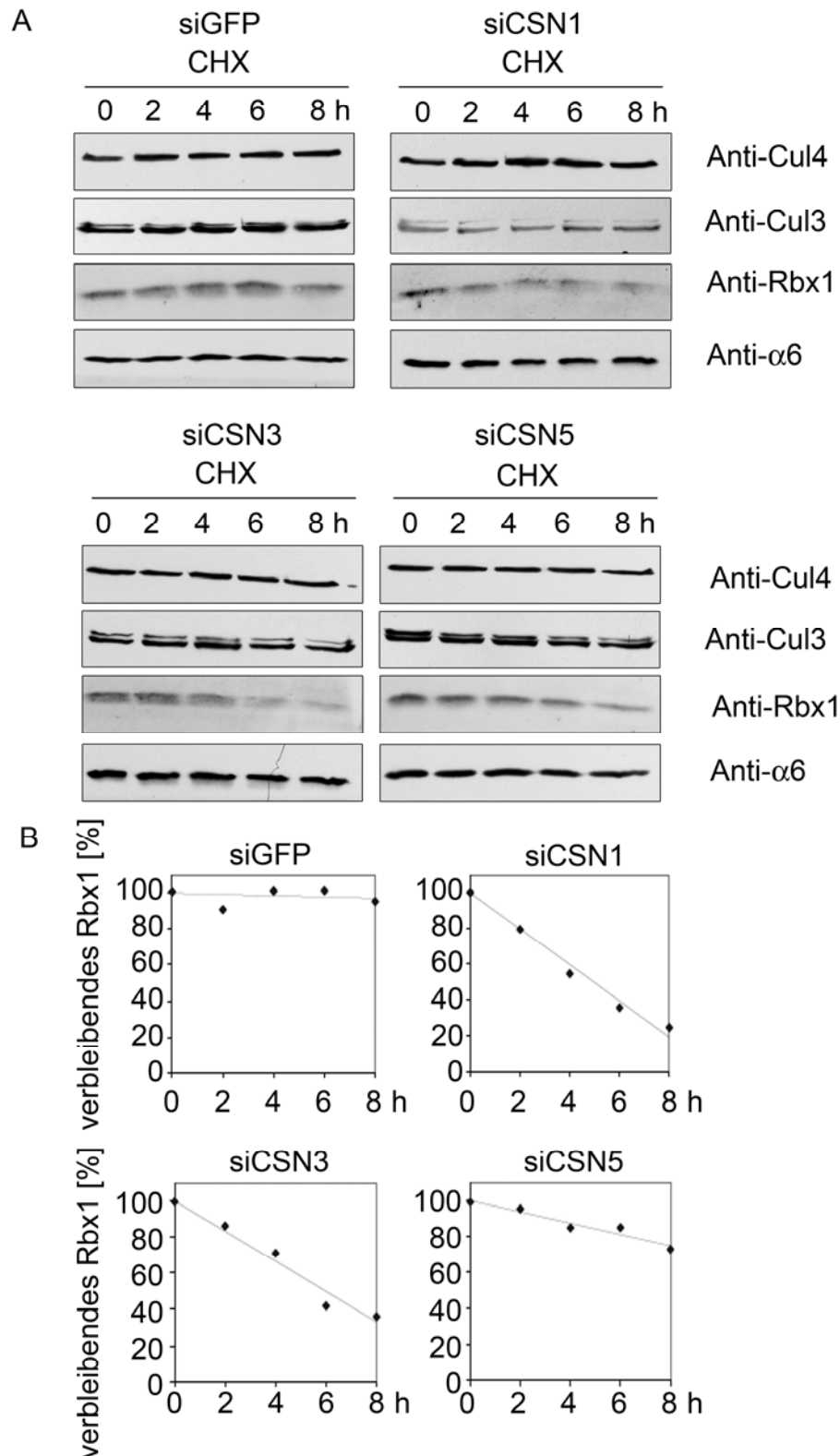


**Abb. 17: Kinaseaktivität des CSN aus siCSN5-Zellen**

Immunopräzipitationen (IP) aus Lysaten von  $1 \times 10^7$  siGFP- und siCSN5-Zellen wurden mittels Anti-CSN7-Antikörper vorgenommen. Das Präzipitat wurde mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert und anschließend für SDS-PAGE verwendet. Das getrocknete Gel wurde auf Röntgenfilmen exponiert.

### 3.1.2. Effekte der CSN-siRNA auf die Stabilität von Komponenten der CRLs

Das CSN wurde als Regulator der CRLs beschrieben, deren Stabilität durch das CSN und USP15 reguliert wird. Der Knockout des CSN führte zur Destabilisierung von Cullinen (He et al., 2005), was in diesem Modell überprüft werden sollte. Dazu wurden Cycloheximid-Chase-Versuche durchgeführt. In diesen Experimenten wurde die Stabilität von Cullinen, sowie des RING-Finger-Protein Rbx1 untersucht. Für alle drei untersuchten CSN-siRNAs konnte gezeigt werden, dass keine Effekte auf die Stabilität von Cullin3 oder Cullin4 vorhanden waren. Diese waren über den Versuchszeitraum von acht Stunden stabil. Allerdings konnte eine Destabilisierung von Rbx1, dem RING-Finger-Protein, welches die Bindung der E2s an die CRLs vermittelt, beobachtet werden. Dieser Effekt war am schwächsten in siCSN5-Zellen (Abb. 18).



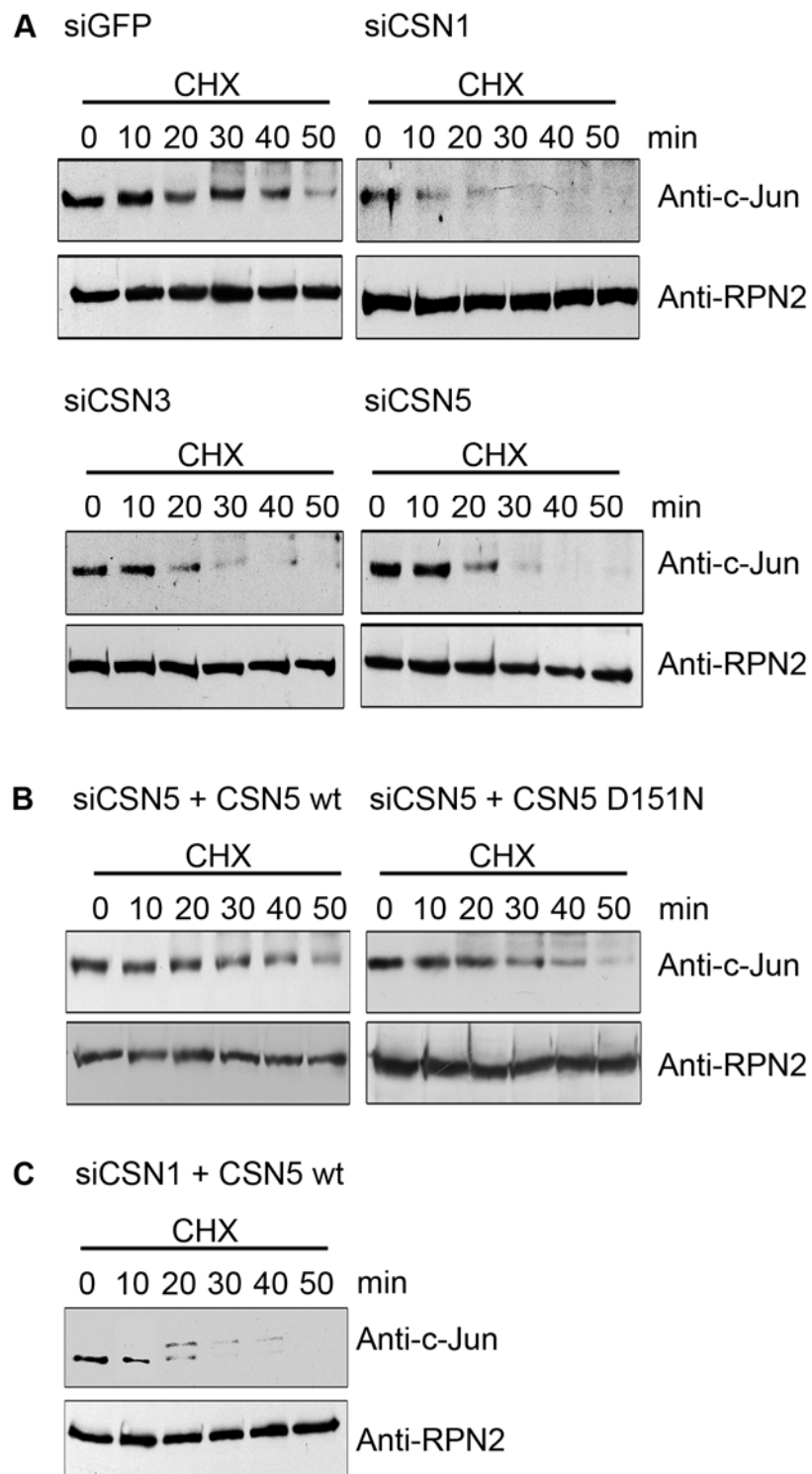
**Abb. 18: Effekte von CSN-siRNAs auf die Stabilität von Komponenten der CRLs**  
 Cycloheximid-Chases von siGFP-, siCSN1-, siCSN3- und siCSN5-Zelllinien wurden durchgeführt. Dabei wurde ein Zeitraum von 0 – 8 Stunden untersucht. Die Zeitreihen wurden mittels Western-Blot auf die Stabilität von Bestandteilen von CRLs untersucht. Dazu wurden Anti-Cul3-, Anti-Cul4- und Anti-Rbx1-Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente  $\alpha 6$ . Die Bandenintensitäten von Rbx1 wurden densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt (B).

### 3.1.3. Effekte der CSN-siRNA auf Abbau und Phosphorylierung von c-Jun

Die weitere Charakterisierung der siRNA-Zelllinien erfolgte über Untersuchungen zum Abbau von Substraten, deren Stabilität durch das CSN reguliert wird. Als Modellsubstrat wurde c-Jun ausgewählt. Der Abbau von c-Jun wird durch die CSN-vermittelte Phosphorylierung verhindert (Naumann et al., 1999; Uhle et al., 2003). Dazu ist die Bindung über CSN5 an das CSN notwendig (Naumann et al., 1999). In siGFP-Zellen betrug die Halbwertszeit von c-Jun etwa 45 Minuten (Abb. 19 A). In allen drei CSN-siRNA-Linien konnte eine stark beschleunigte Proteolyse von c-Jun gezeigt werden. Dieser Effekt war in den siCSN1- und siCSN3-Zellen besonders ausgeprägt. Nach 30 Minuten konnte c-Jun mittels Western-Blot kaum noch nachgewiesen werden.

Der CSN-Komplex in siCSN5-Zellen verfügte noch über die assoziierten Kinasen (siehe Abb. 17). Dies ermöglichte die getrennte Untersuchung der Deneddylierung der CLRs durch das CSN und Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen auf den Abbau von c-Jun. Deshalb wurde CSN5wt und eine deneddylierungsdefiziente Mutante CSN5D151N in siCSN5-Zellen transfiziert (Abb. 19 B). In siCSN5-Zellen wurden diese Konstrukte in das CSN eingebaut, dies war in Abb. 21B für das CSN5wt gezeigt. Es konnte eine Wiederherstellung der Deneddylierung nach der Transfektion von CSN5wt nachgewiesen werden (Abb. 16 A). Damit wurde durch beide Konstrukte die Bindungsstelle von c-Jun an den CSN-Komplex in siCSN5-Zellen wiederhergestellt. Die Transfektion von CSN5wt und CSN5D151N konnte den Abbau von c-Jun wieder normalisieren. Die Transfektion von CSN5D151N führte nicht vollständig zur Wiederherstellung der Abbaurate im Vergleich zur Transfektion mit dem Wildtyp. Die Expression von CSN5D151N war jedoch leicht geringer als die von CSN5wt (Daten nicht gezeigt).

Als Kontrolle für diese Wiederherstellungsversuche des c-Jun-Abbaus wurde eine Transfektion von siCSN1-Zellen mit CSN5wt durchgeführt. In siCSN1-Zellen lag eine Reduktion der Menge an CSN-Komplex vor. Eine Erhöhung der Menge an CSN5 beeinflusste die restlichen Untereinheiten nicht (Naumann et al., 1999). Daher sollte die Transformation von CSN5wt in siCSN1-Zellen keinen Effekt haben, da hierfür die Stabilisierung des gesamten CSN mit den assoziierten Kinasen notwendig sein sollte. Dies konnte auch nach der Transfektion von CSN5 in siCSN1-Zellen beobachtet werden. Es war nicht möglich durch die erhöhte Menge an CSN5 alleine die Proteolyse von c-Jun zu beeinflussen (Abb. 19 C).



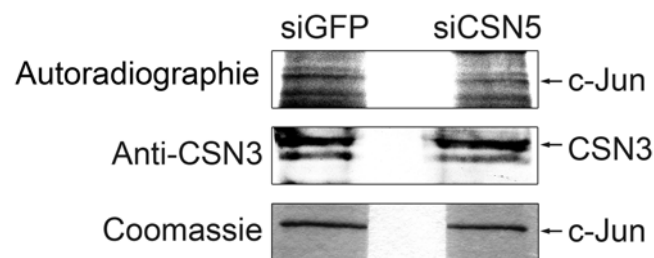
**Abb. 19: Die Proteolyse von c-Jun ist in CSN-siRNA Zellen beschleunigt**

Der Abbau von c-Jun wurde mittels Cycloheximid-Chase untersucht. Es wurde dazu der Zeitraum von 0 – 50 Minuten gewählt in welchem der Abbau mittels Western-Blot verfolgt wurde. Als Ladekontrolle wurde RPN2 verwendet. In (A) ist der Abbau für die siGFP-, siCSN1-, siCSN3- und siCSN5-Zellen gezeigt. In (B) wurde versucht, durch Transfektion von CSN5wt oder CSN5D151N in siCSN5-Zellen den Abbau von c-Jun wieder zu normalisieren. Für siCSN1-Zellen wurde dies nach Transfektion mit CSN5wt untersucht (C).

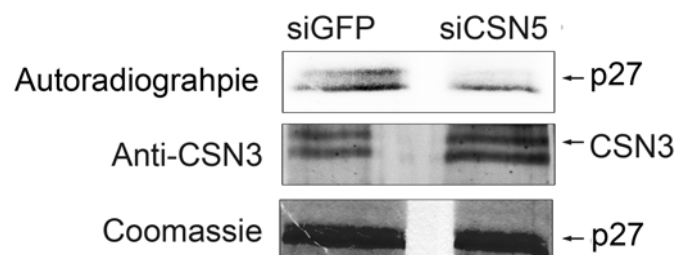


Die beschleunigte Proteolyse von c-Jun in den CSN-siRNA Zellen ließ auf eine verminderte Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen schließen. Es wurde deshalb untersucht, ob eine verminderte Phosphorylierung von c-Jun in siCSN5-Zellen vorlag. Dazu wurde das CSN aus siGFP- und siCSN5-Zellen präzipitiert und mit rekombinanten c-Jun in der Gegenwart von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  inkubiert (Abb. 20 A). In der Autoradiographie war eine Reduktion der Phosphorylierung von c-Jun durch das CSN aus siCSN5-Zellen sichtbar. Als Vergleich für die eingesetzte Menge an CSN-Komplex wurde ein Anti-CSN3-Antikörper verwendet. Dieser Versuchsansatz wurde mit p27 wiederholt (Abb. 20 B), um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung auch bei anderen, an CSN5 bindende Proteine verändert ist. Die Bindung von p27 an CSN5 führt ebenfalls zu dessen Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen (Huang et al., 2006). In diesem Versuch wurde der gleiche Effekt wie bei c-Jun gefunden. Das aus siCSN5-Zellen präzipitierte CSN zeigte eine verminderte Phosphorylierungsaktivität gegenüber p27.

A IP: Anti-CSN7



B IP: Anti-CSN7



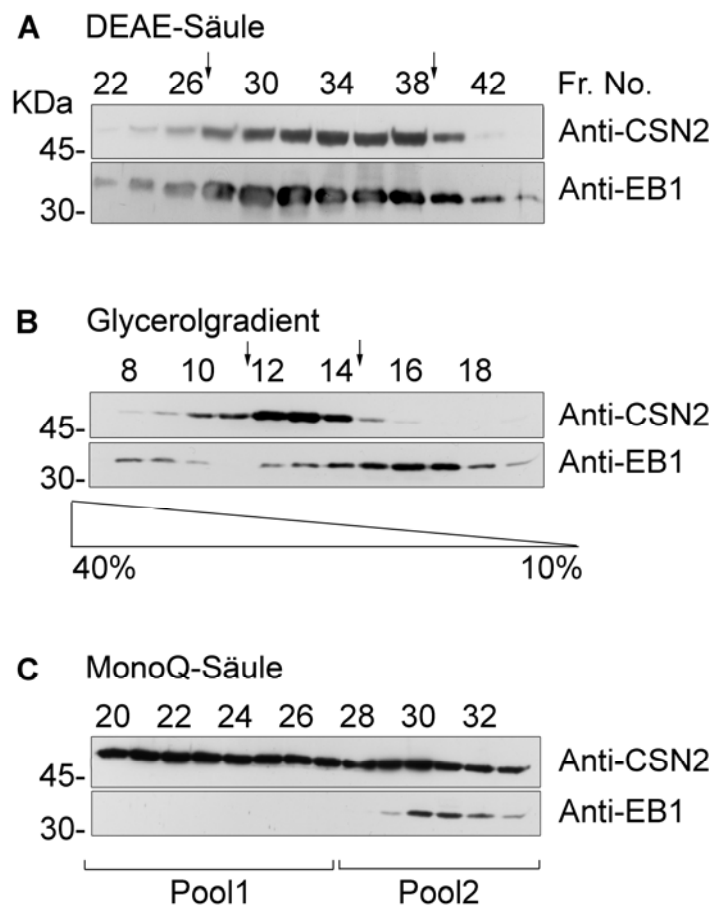
**Abb. 20: Phosphorylierung von c-Jun und p27 durch den CSN-Komplex aus siCSN5-Zellen**

Immunopräzipitationen (IP) des CSN wurden mittels Anti-CSN7-Antikörper aus siGFP- und siCSN5-Zellen durchgeführt. Der Komplex wurde dann *in vitro* zur Phosphorylierung von rekombinantem c-Jun (A) und p27 (B) in Gegenwart von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  verwendet. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel halbiert und mit Coomassie gefärbt, bzw. für einen Western-Blot verwendet. Das getrocknete Gel wurde auf Röntgenfilmen exponiert. Als Vergleichswert für die eingesetzte Menge an CSN diente der Western-Blot mit einem Anti-CSN3-Antikörper.

### 3.2. Interaktion von EB1 mit dem CSN

#### 3.2.1. Ko-Purifizierung von EB1 mit dem CSN

Bei der systematischen Untersuchung des aus Erythrozyten aufgereinigten CSN auf assoziierte Proteine mittels Massenspektrometrie wurde EB1 gefunden (siehe Abb. 11). EB1 sollte als neuer Interaktionspartner des CSN charakterisiert werden. Die Detektion von EB1 in dem aufgereinigten CSN legte eine Assoziation mit dem CSN während der Aufreinigung nahe. Daher wurden die einzelnen Stufen der Präparation auf die Ko-Aufreinigung von EB1 mit dem CSN hin untersucht. (Abb. 21). Die Ko-Aufreinigung von EB1 mit dem CSN wurde mittels Western-Blot verfolgt.



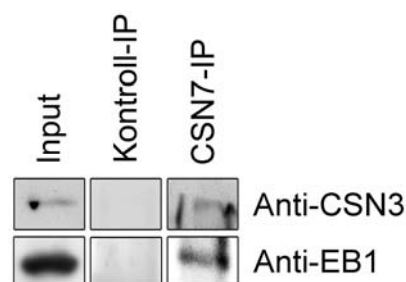
#### Abb. 21: Ko-Aufreinigung von EB1 mit dem COP9-Signalosom Komplex

Der CSN-Komplex wurde aus Erythrozyten aufgereinigt. Dabei wurden die einzelnen Schritte der Aufreinigung mittels Western-Blot auf die Verteilung von EB1 und des CSN untersucht. In (A) ist die Elution des CSN nach der DEAE-Säule abgebildet. In den Fraktionen 22 - 42 war eine Ko-Elution von EB1 mit dem CSN nachweisbar. Die Fraktionen 28 - 38 wurden vereinigt und auf einen Glycerolgradienten (B) aufgetragen. Eine Ko-Sedimentation war in den Fraktionen 12 - 14 nachweisbar. Diese wurden auf eine MonoQ-Säule aufgetragen (C). Der CSN-Komplex eluiert in zwei Pools, der Zweite zeigte eine Ko-Elution mit EB1.

Ausgewählte Fraktionen des jeweiligen Schrittes der Präparation wurden mittels Western-Blot auf EB1 und das CSN hin untersucht. Zunächst wurde das Lysat der Erythrozyten auf eine DEAE-Säule aufgetragen (Abb. 21 A). In den eluierten Fraktionen war eine fast vollständig überlappende Verteilung von EB1 mit CSN2 nachweisbar. Die Fraktionen 28 – 48 wurden vereinigt und nach einer Ammoniumsulfatfällung (45% Sättigung) auf einen Glycerolgradienten (10 - 40% (v/v) Glycerol) aufgetragen (Abb. 21 B). In den Fraktionen 12 – 14 sedimentierte das CSN und ein Teil des EB1; der Großteil von EB1 war jedoch in Fraktionen niedrigerer Dichte. EB1 konnte aber auch in Fraktionen höherer Dichte nachgewiesen werden. Im finalen Aufreinigungsschritt, einer MonoQ-Säule (Abb. 21 C), eluierte das CSN in zwei Pools. Der zweite Pool mit stärkerer negativer Ladung war mit EB1 assoziiert.

### 3.2.2. Interaktion von EB1 mit dem CSN in HeLa-Zellen

Die gemeinsame Aufreinigung von EB1 und dem CSN könnte durch eine Bindung von EB1 an das CSN verursacht werden. Dies wurde in HeLa-Zellen überprüft. Dazu wurden HeLa-Zellen lysiert und das CSN mittels Anti-CSN7-Antikörper immunopräzipitiert (Abb. 22). Das Präzipitat wurde mittels Western-Blot auf EB1 und das CSN untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Teil des zellulären EB1 mit dem CSN ko-präzipitiert werden konnte. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurde ein Anti-GST-Antikörper verwendet, welcher das CSN nicht präzipitierte (Kontroll-IP).

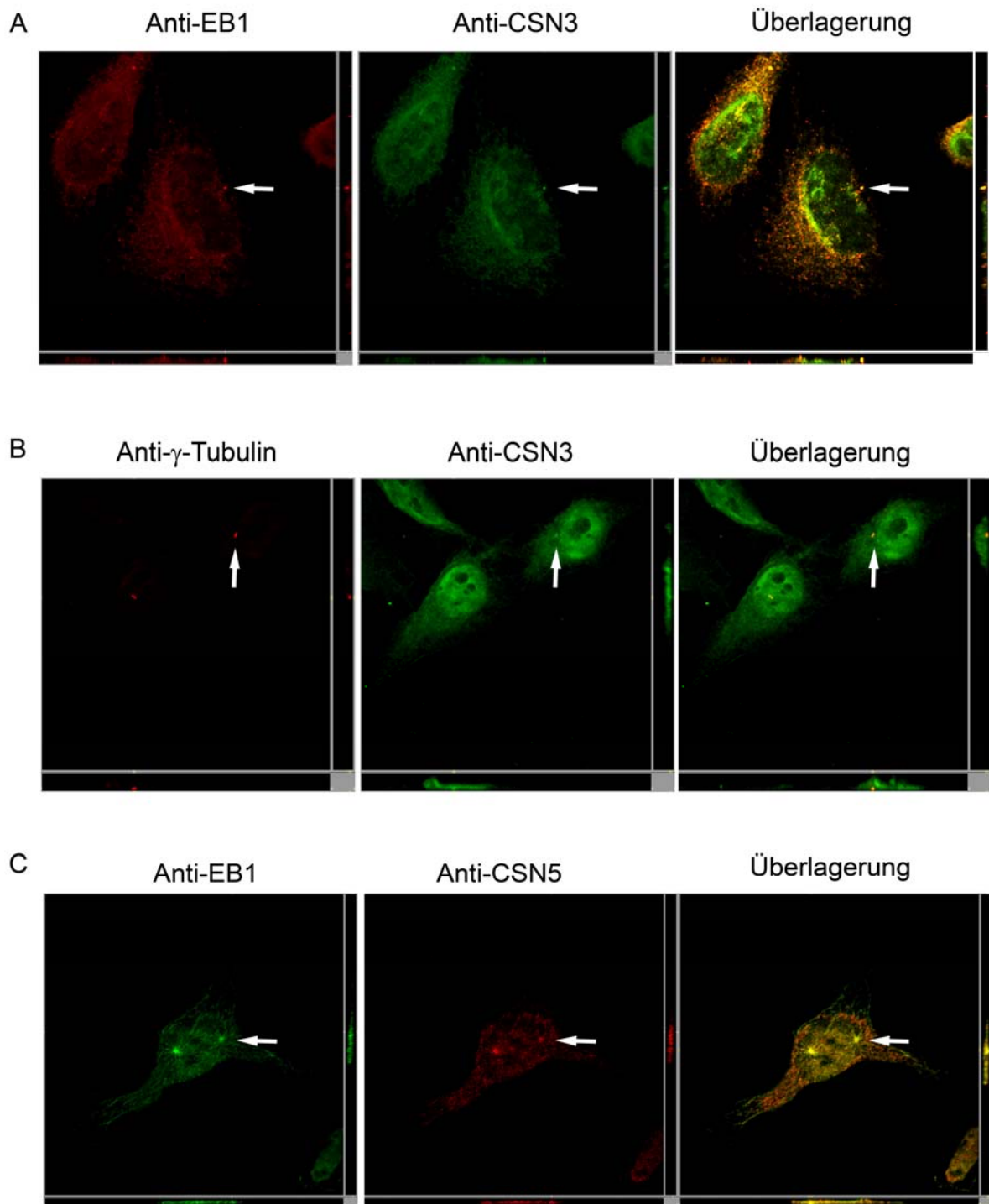


#### Abb. 22: Ko-Immunopräzipitation von EB1 mit dem CSN

HeLa-Zellen wurden lysiert und der CSN Komplex mit dem Anti-CSN7-Antikörper immunopräzipitiert. Als Kontrolle wurde der Anti-GST-Antikörper verwendet, welcher das CSN nicht präzipitierte. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Dazu wurden Anti-CSN3- und Anti-EB1-Antikörper verwendet.

In diesen Versuchen konnte eine Bindung von EB1 mit dem CSN nachgewiesen werden. Die zelluläre Lokalisation der CSN-EB1 Interaktion wurde mittels Immunofluoreszenz (IF) untersucht (Abb. 23). Dazu wurden HeLa-Zellen fixiert und gleichzeitig mit Antikörpern gegen EB1 und CSN3 gefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie in Kooperation mit Jan Peter Böttcher am MPI für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt. In Abb. 23 A ist die Färbung mit Anti-EB1- und Anti-CSN3-Antikörpern dargestellt. EB1 zeigte eine cytoplasmatische Verteilung, während das CSN vorwiegend im Kern, aber auch im Cytoplasma, vorkam. In der Überlagerung der Färbungen konnte die Interaktion auf einen Bereich in der Nähe des Nukleus, höchstwahrscheinlich das Centrosom, eingegrenzt werden. Eine Überlagerung der Färbungen an den (+)-Enden der Mikrotubuli konnte nicht nachgewiesen werden.

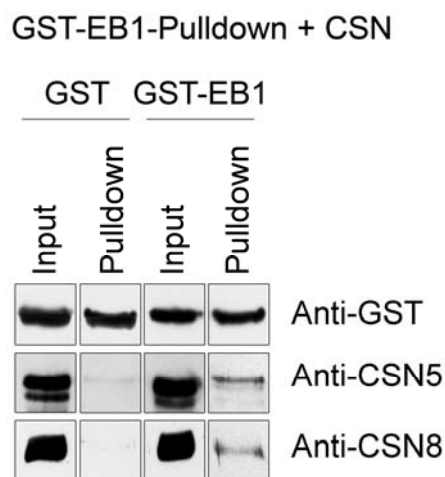
Die Lokalisation des CSN im Centrosom war noch nicht beschrieben, weshalb Immunofluoreszenzen von  $\gamma$ -Tubulin und CSN3 durchgeführt wurden (Abb. 23 B).  $\gamma$ -Tubulin ist in Zellen exklusiv im Inneren des Centrosoms lokalisiert. Eine Überlagerung der Färbungen von CSN3 und  $\gamma$ -Tubulin konnte nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Lokalisation des CSN im Centrosom, dessen Assoziation mit EB1 bereits bekannt ist (Louie et al., 2004). Somit ist eine Interaktion von EB1 mit dem CSN im Bereich des Centrosoms sehr wahrscheinlich. Die in Abb. 23 A+B gezeigten Zellen befanden sich in der Interphase. Deshalb wurde HeLa-Zellen mit Anti-EB1- und Anti-CSN5-Antikörpern angefärbt und nach Zellen in der Mitose gesucht (Abb. 23 C). Auch während der Mitose wurde eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale im Centrosom beobachtet. Im Vergleich zur Färbung in der Interphase konnte in der Mitose eine gleichmäßige Verteilung des CSN in der Zelle beobachtet werden.

**Abb. 23: Zelluläre Lokalisation der Interaktion von EB1 und dem CSN**

Die Ko-Lokalisation von EB1 und dem CSN wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen fixiert und mittels Anti-EB1- und Anti-CSN3-Antikörper gefärbt (A). Die Überlagerung der Färbungen zeigt eine Ko-Lokalisation von EB1 (rot, Cy3) und CSN5 (grün, Cy2) in der Nähe des Nukleus, möglicherweise im Centrosom. Die Lokalisation des CSN im Centrosom (B) wurde über die Ko-Immunofluoreszenz von  $\gamma$ -Tubulin und CSN3 untersucht. Die Fluoreszenzsignale zeigen eine Überlagerung von CSN3 (grün, Cy2) und  $\gamma$ -Tubulin (rot, Cy3). In (C) wurde eine Zelle aufgenommen, welche sich in der Mitose befindet. Diese wurde mit Anti-EB1 (grün, Cy2) und Anti-CSN5 (rot, Cy3) angefärbt (konfokale Mikroskopie wurde von J.P. Böttcher, MPI für Infektionsbiologie, durchgeführt).

### 3.2.3. Direkte Bindung von EB1 an das CSN

Die Immunopräzipitation und die Ko-Immunofluoreszenz von EB1 mit dem CSN ermöglichten nicht den Nachweis einer direkten Bindung von EB1 an das CSN. Interaktionsstudien mit dem aufgereinigten CSN und rekombinant hergestelltem GST-EB1 wurden *in vitro* durchgeführt, um eine direkte Bindung nachzuweisen (Abb. 24). Dazu wurde das GST-markierte EB1 mit dem CSN inkubiert. Danach wurde EB1 mittels GSH-Agarose präzipitiert und das Präzipitat (Pulldown) auf CSN-Untereinheiten hin mittels Western-Blot untersucht. Die Untereinheiten CSN5 und CSN8 konnten im Präzipitat nachgewiesen werden, was eine direkte Bindung von EB1 an das CSN zeigte. Die Spezifität der Interaktion wurde über einen Kontrollansatz mit GST alleine überprüft. Hier konnten nur minimale Mengen an CSN-Untereinheiten im Pulldown nachgewiesen werden.



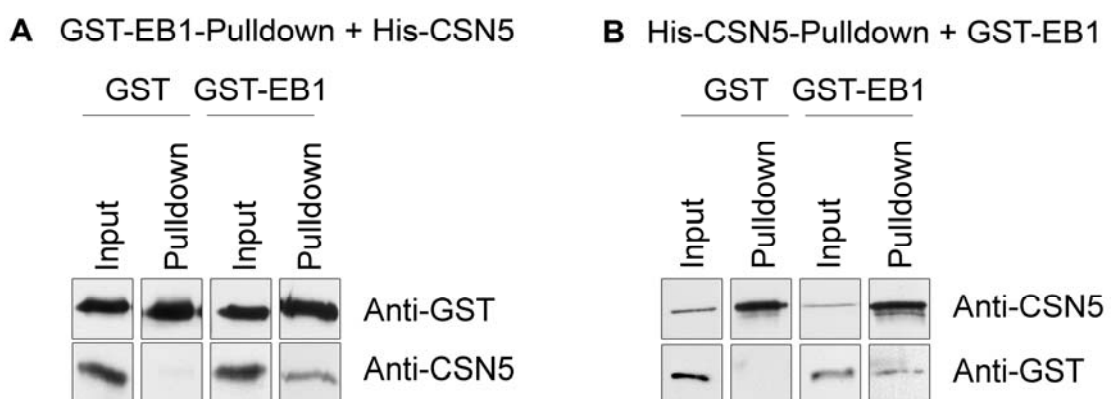
**Abb. 24: Direkte Bindung von EB1 an das CSN *in vitro***

GST-EB1 oder GST alleine wurden mit dem aufgereinigten CSN Komplex *in vitro* inkubiert. Danach wurde EB1 oder GST mittels GSH-Agarose präzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels Western-Blot auf die Ko-Präzipitation von CSN-Untereinheiten untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels der Anti-CSN5 und Anti-CSN8-Antikörper. Der Anti-GST-Antikörper wurde zur Überprüfung der gleichmäßigen Präzipitation aus beiden Ansätzen verwendet.

### 3.2.4. Bindung von EB1 über CSN5 an das CSN

Um die Untereinheit des CSN zu identifizieren, welche die Bindung an EB1 vermittelt, wurden Filterbindungsversuche mit den rekombinant hergestellten CSN-Untereinheiten und EB1 durchgeführt. Dabei wurde nur eine signifikante Interaktion mit CSN5 gefunden (Daten nicht gezeigt). Diese Interaktion wurde nochmals mittels

Pulldown-Experimenten untersucht (Abb. 25). Dazu wurde His<sub>6</sub>-markiertes CSN5 mit GST-markiertem EB1 inkubiert und jeweils Pulldowns für EB1 (Abb. 25 A) oder CSN5 (Abb. 25 B) über den entsprechenden Tag durchgeführt. EB1 wurde mittels GSH-Agarose und CSN5 über Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Es konnte mit beiden Methoden eine Interaktion von CSN5 mit EB1 nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden Versuche mit GST alleine und CSN5 oder von EB1 mit CSN2, CSN3 oder CSN7 durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Interaktionen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).



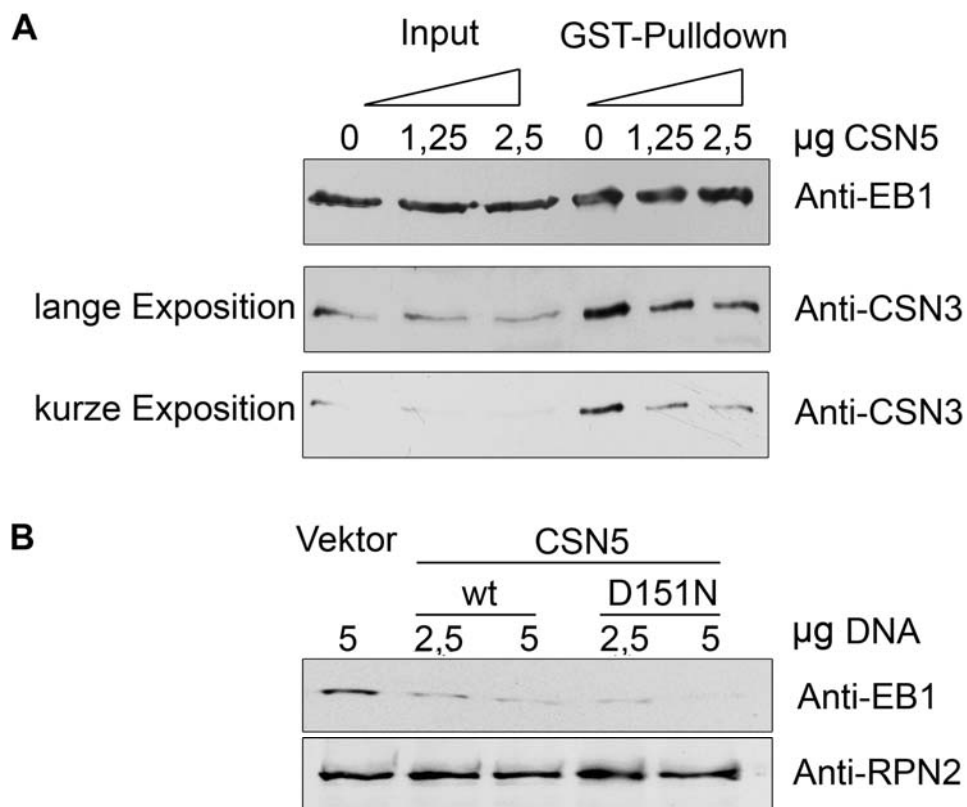
#### Abb. 25: Bindung von EB1 an CSN5

GST-markiertes EB1 und His<sub>6</sub>-markiertes CSN5 wurden *in vitro* miteinander inkubiert. Danach erfolgte die Präzipitation von EB1 über GSH-Agarose (A) oder von CSN5 mittels Ni-NTA-Agarose (B). Als Kontrolle wurde jeweils GST verwendet. Die Präzipitate wurden mittels Western-Blot die Ko-Präzipitation von CSN5, bzw. EB1 untersucht. Dazu wurden die Anti-GST- und Anti-CSN5-Antikörper benutzt.

Die Bindung von EB1 an das CSN wurde durch CSN5 vermittelt. Diese Interaktion wurde weitergehend charakterisiert. Dabei sollte untersucht werden, ob Affinitäten von Komplex-gebundenem CSN5 und freiem CSN5 zu EB1 unterschiedlich sind. Diese Annahme beruhte auf der fehlenden Deneddylaseaktivität von freiem CSN5, was möglicherweise durch eine Konformationsänderung verursacht wird. Dies wurde in einem Kompetitionsexperiment von CSN5 gegen den CSN-Komplex um die Bindung von EB1 untersucht. Zunehmende Mengen an CSN5 wurden mit gleichbleibenden Mengen an CSN-Komplex und GST-EB1 inkubiert. Nach der Präzipitation von EB1 wurde die Menge an gebundenem CSN bestimmt. (Abb. 26 A). Dabei entsprach 2,5 µg CSN5 einem 4-fachen molaren Überschuss an freiem CSN5 gegenüber dem CSN-Komplex. Mit aufsteigenden Mengen an CSN5 fand eine

Verdrängung des CSN von EB1 statt. Versuche mit BSA als unspezifisches Protein hatten nur bei sehr hohem Überschuss geringe Effekte auf die Bindung von EB1 an das CSN (Daten nicht gezeigt).

Die Verdrängung von EB1 vom CSN-Komplex durch freies CSN5 wurde in HeLa-Zellen weitergehend untersucht. Eine Transfektion von CSN5 in HeLa-Zellen führte nicht zum Einbau von CSN5 in den Komplex. Das transfizierte CSN5 lag in freier Form vor (Naumann et al., 1999). Die Transfektion von Flag-CSN5 führte konzentrationsabhängig zu einer starken Reduktion von EB1 im Steady-State (Abb. 26 B). Dieser Effekt trat ebenfalls bei einer katalytisch inaktiven Mutante (D151N) von CSN5 auf.



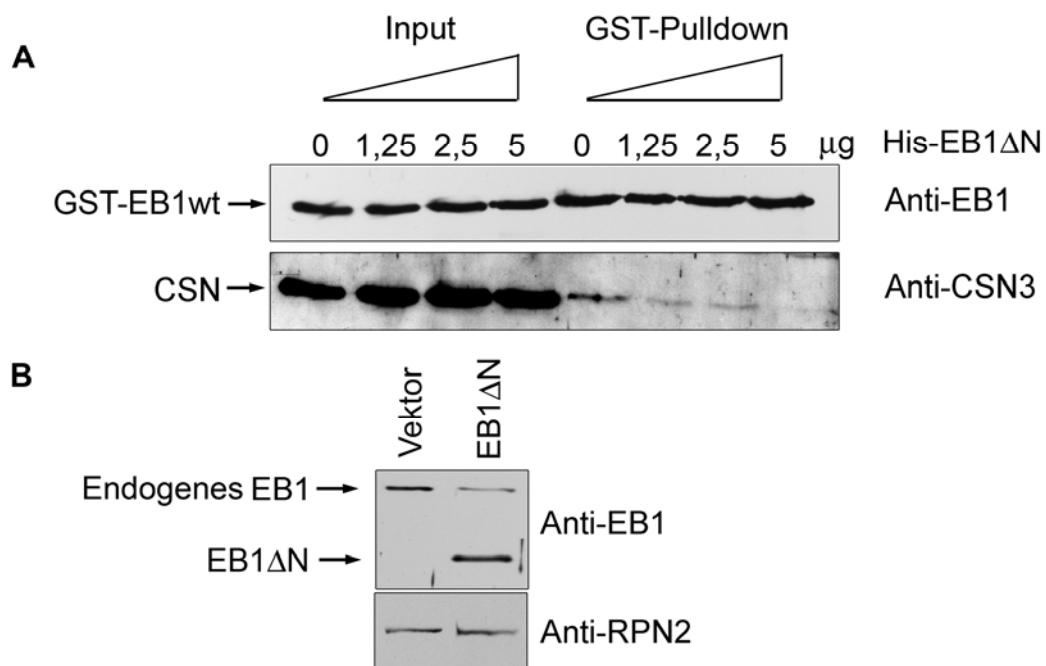
**Abb. 26: Konkurrenz von CSN5 und dem CSN-Komplex um die Bindung von EB1**

In (A) wurden gleichbleibende Mengen von CSN-Komplex und GST-EB1 mit zunehmenden Mengen an CSN5 inkubiert. Danach wurde GST-EB1 mittels GSH-Agarose präzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels Western-Blot auf die gebundene Menge an CSN-Komplex untersucht. Dazu wurde ein Anti-CSN3-Antikörper verwendet. Für den Input wurden 10% der jeweils eingesetzten Mengen aufgetragen. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit CSN5 ist in (B) abgebildet. Es wurden jeweils 2,5 und 5 µg DNA von CSN5wt und CSN5D151N transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden lysiert und mittels Western-Blot auf die im Steady-State verbliebene Menge von EB1 untersucht. Als Ladekontrolle wurde RPN2 verwendet.



### 3.2.5. Bindung von EB1 über dessen C-Terminus an das CSN

Die Bindung von EB1 an den CSN-Komplex schien eine stabilisierende Wirkung auf EB1 in HeLa-Zellen zu haben. Deshalb wurde versucht, die Bindung an das CSN durch Konkurrenz mit EB1-Fragmenten oder Mutation von EB1 zu beeinflussen. Dazu wurde ein C-terminales Fragment (EB1 $\Delta$ N) von EB1 kloniert. Dieses Fragment wurde um die N-terminale CH-Domäne verkürzt und enthielt die Dimerisierungsdomäne von EB1. Die bisher bekannten Interaktionspartner von EB1 binden in diesem Bereich (Slep et al., 2005). Zunächst wurde ein Konkurrenzexperiment von GST-EB1wt und His<sub>6</sub>-markiertem EB1 $\Delta$ N um die Bindung an das CSN durchgeführt (Abb. 27 A).



**Abb. 27: EB1 $\Delta$ N verhindert die Bindung von EB1wt an das CSN**

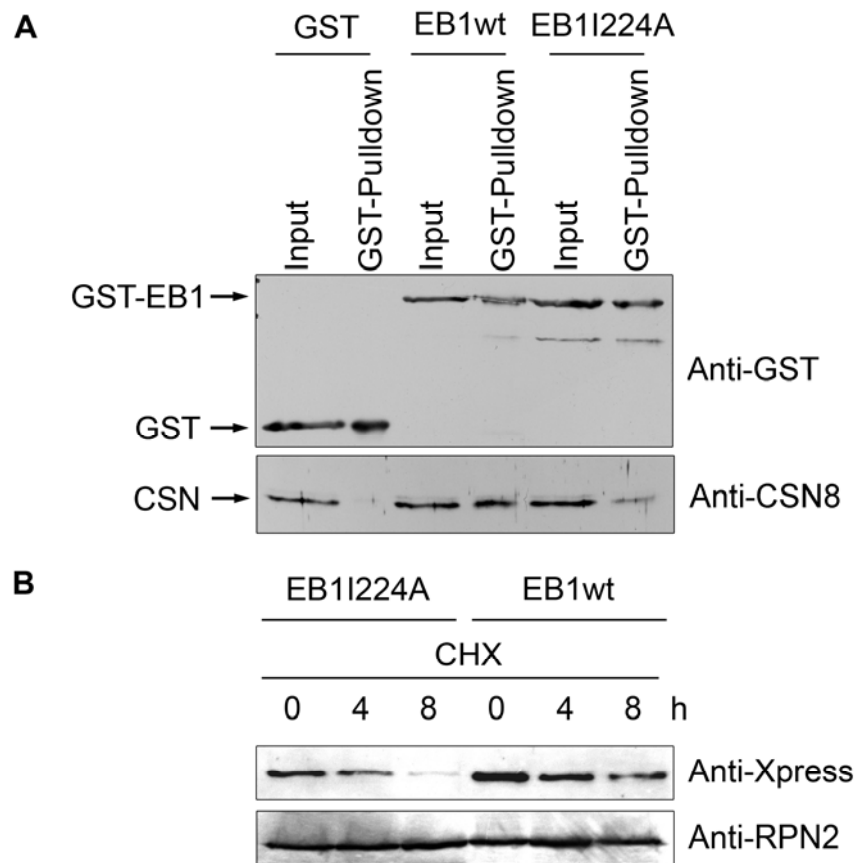
In (A) wurde ein Konkurrenzexperiment von GST-EB1wt und EB1 $\Delta$ N um die Bindungsstelle am CSN durchgeführt. Dazu wurden gleichbleibende Mengen an GST-EB1wt und dem CSN-Komplex mit zunehmenden Mengen an EB1 $\Delta$ N inkubiert. Anschließend wurden GST-Pulldowns von GST-EB1wt durchgeführt und die gebundene Menge an CSN mittels Western-Blot nachgewiesen. In (B) wurde EB1 $\Delta$ N in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot auf die verbleibende Menge an EB1 untersucht. Sowohl endogenes EB1, als auch das transfizierte Konstrukt konnten mittels Anti-EB1-Antikörper nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde RPN2 verwendet.

Dazu wurden konstante Mengen an CSN und GST-EB1 mit aufsteigenden Mengen an EB1 $\Delta$ N inkubiert. Eine Menge von 5  $\mu$ g EB1 $\Delta$ N entsprach in etwa einem 3:1 molaren Überschuss des Fragmentes gegenüber GST-EB1. Im anschließenden GST-Pulldown von GST-EB1wt wurde die gebundene Menge an CSN mittels Western-Blot abgeschätzt. Dabei wurde gezeigt, dass durch zunehmende Mengen an EB1 $\Delta$ N im Ansatz verminderte Mengen an CSN3 im Pulldown nachweisbar waren.

Die Verdrängung von EB1wt vom CSN durch das C-terminale Fragment wurde in HeLa-Zellen weiter untersucht (Abb. 27 B). Dazu wurden die Zellen mit EB1 $\Delta$ N transfiziert und die Menge an EB1 im Steady-State 24 Stunden nach der Transfektion abgeschätzt. Im Western-Blot wurde eine deutliche Reduktion des endogenen EB1 nach einer Transfektion von 5  $\mu$ g DNA beobachtet. Die Transfektion von 10  $\mu$ g EB1 $\Delta$ N-cDNA führte zum massiven Absterben der Zellen.

### **3.2.6. EB1 bindet als Dimer an das CSN**

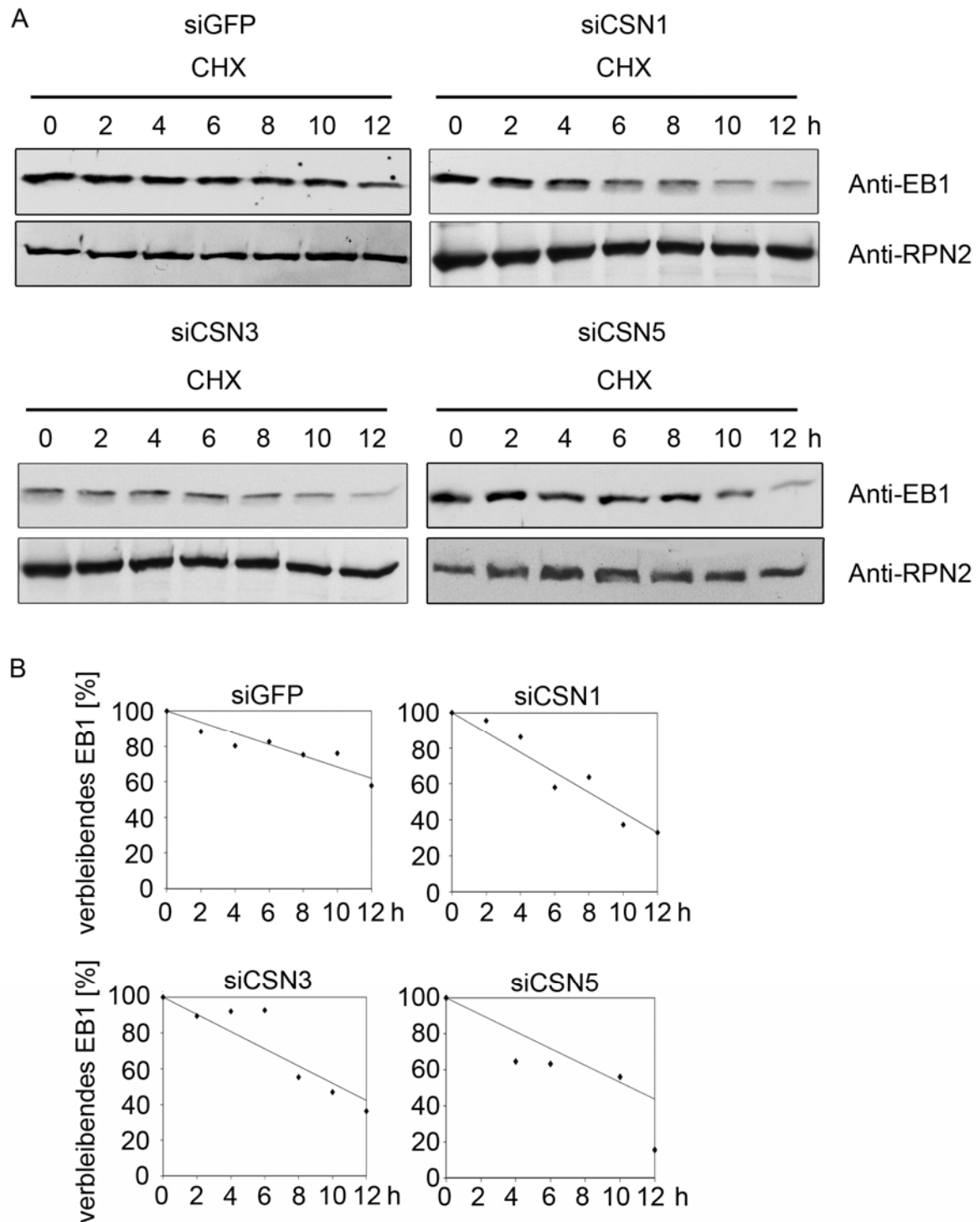
Der C-Terminus von EB1 schien die Bindung von EB1 an das CSN zu vermitteln. Dieser ist für die Ausbildung von EB1-Dimeren notwendig. Die Dimerisierung von EB1 ist essentiell für dessen Interaktion mit anderen Proteinen (Slep et al., 2005). Um zu testen, ob dies auch die Bindung von EB1 an das CSN betrifft, wurde EB1wt mit EB1I224A verglichen. Diese Mutante von EB1 war nicht mehr in der Lage, Dimere auszubilden. Gleiche Mengen von EB1wt oder EB1I224A wurden mit dem aufgereinigtem CSN inkubiert und EB1 mittels GST-Tag präzipitiert. Die Menge an gebundenem CSN wurde mittels Western-Blot abgeschätzt. Aus den *in vitro*-Pulldowns ging hervor, dass die Mutante schlechter als der Wildtyp an das CSN binden konnte (Abb. 28 A). Die verminderte Bindung an das CSN sollte im Zellkulturmodell zum beschleunigten Abbau von EB1I224A führen, da EB1 durch das CSN stabilisiert wurde. Die Stabilität von EB1I224A wurde durch Transfektionen in HeLa-Zellen mit anschließendem Cycloheximid-Chase für acht Stunden untersucht. Der Abbau der transfizierten EB1 Proteine wurde mittels Western-Blot unter Verwendung eines Anti-Xpress-Antikörpers verfolgt. Im Vergleich zum transfiziertem Wildtyp-EB1 wurde die Mutante doppelt so schnell abgebaut (Abb. 28 B).



**Abb. 28: Die Dimerisierung von EB1 ist notwendig für die Bindung an das CSN**  
 Die Bindung von EB1wt und EB1I224A an das CSN wurden verglichen (A). GST-EB1 und GST-EB1I224A wurden mit dem CSN inkubiert und mittels GSH-Agarose präzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels Western-Blot auf gebundenes CSN untersucht. Dazu wurde ein Anti-CSN8-Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde die GST alleine benutzt. Die Stabilität von EB1I224A und EB1wt wurde nach Transfektion von HeLa-Zellen bestimmt (B). Dazu wurde 24 Stunden nach der Transfektion Cycloheximid-Chases über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt. Der Abbau von EB1I224A und EB1wt wurde mittels Western-Blot verfolgt. Zur Detektion wurde ein Anti-Xpress-Antikörper verwendet. RPN2 diente als Ladekontrolle für das Gel.

### 3.2.7. Beschleunigter Abbau von EB1 in CSN-siRNA-Zelllinien

Die Bindung von EB1 an das CSN führte zu dessen Stabilisierung. Eine Störung der Interaktion bewirkt den Abbau von EB1 im Zellkulturmodell (siehe Abb. 26 A, 27 A, 28 A). Dies sollte nun durch siRNA-Studien des CSN weiter untersucht werden. Im Knockdown von CSN1 oder CSN3 konnte eine Verminderung von EB1 im Steady-State (siehe Abb. 12 A) nachgewiesen werden. Diese Abnahme war ein spezifischer Effekt, der durch den Knockdown des CSN entstand (siehe Abb. 15).



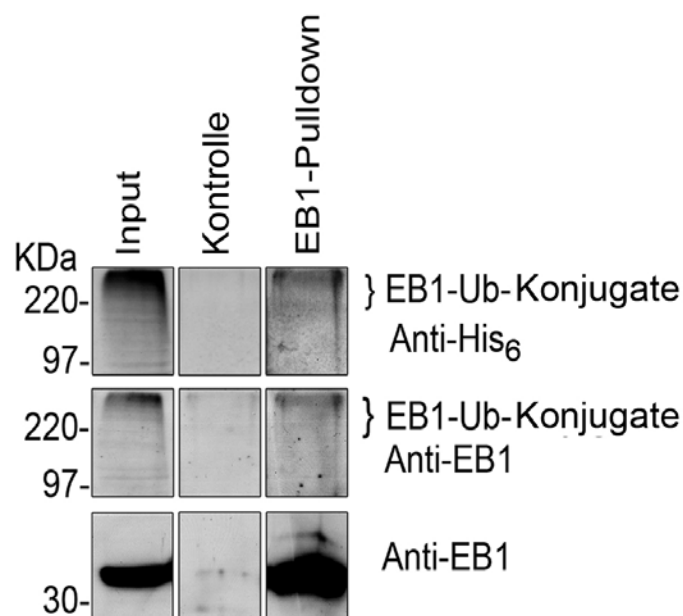
**Abb. 29: Cycloheximid-Chase von EB1 in CSN-siRNA-Zellen**

Der Abbau von EB1 wurde mittels Cycloheximid-Chase untersucht. Dazu wurden die Zelllinien für den angegebenen Zeitraum von 0 – 12 Stunden mit Cycloheximid behandelt und anschließend lysiert. Die Proteolyse von EB1 wurde mittels Western-Blot verfolgt. Als Ladekontrolle wurde ein Anti-RPN2-Antikörper verwendet. Der Abbau von EB1 wurde in siGFP- (Kontrolle), siCSN1-, siCSN3- und siCSN5-Zellen untersucht (A). Eine Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde vorgenommen, um die Abnahme von EB1 über die Zeit graphisch darzustellen (B).

Diese Verminderung von EB1 im Steady-State in den siCSN1- und siCSN3-Zellen könnte durch einen verstärkten Abbau von EB1 verursacht werden. Der zeitliche Verlauf des Abbaus von EB1 in CSN-siRNA Zellen wurde deshalb mittels CHX-Chase-Versuchen untersucht. Eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch CHX ermöglichte die Bestimmung der Abbauraten von EB1 im Zellkulturmodell. Wegen der hohen Stabilität von EB1 wurden Versuche mit einer Laufzeit von zwölf Stunden durchgeführt. Die Experimente zeigten, dass die Verminderung des CSN zu einem beschleunigten Abbau führte (Abb. 26). Dabei schienen die Effekte in siCSN1- und siCSN3-Zellen stärker auszufallen als in den siCSN5-Zellen. In den siCSN5-Zellen war nur ein unwesentlich beschleunigter Abbau von EB1 im Vergleich zu den siGFP-Zellen nachweisbar.

### 3.2.8. Ubiquitin-abhängiger Abbau von EB1

Das CSN schien somit ein Regulator der Proteolyse von EB1 zu sein. Der Abbauweg von EB1 war bisher jedoch unbekannt. Die Beteiligung des CSN sprach für einen Abbau durch das UPS.

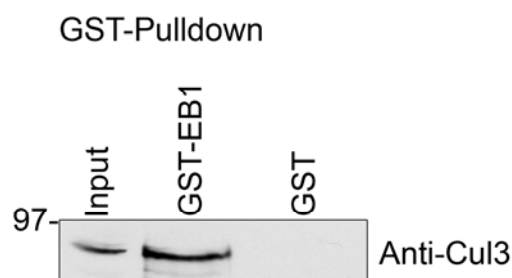


**Abb. 30: Nachweis von EB1-Ubiquitin-Konjugaten**

HeLa-Zellen wurden mit Flag-markiertem EB1 und His-markiertem Ubiquitin ko-transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit den beiden Vektoren ohne Insert transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und EB1 mittels Flag-Pulldown aus dem Lysat isoliert. Das Lysat (Input) und das Präzipitat (Pulldown) wurden mittels Western-Blot auf hochmolekulare EB1-Spezies analysiert. Der Nachweis von Ubiquitin-Konjugaten erfolgte mittels Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper.

Eine Markierung von Proteinen mit Poly-Ub-Ketten dient als Signal für den proteasomalen Abbau. Deshalb wurde überprüft, ob EB1 poly-ubiquitiniert wird. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Flag-markiertem EB1 und His<sub>6</sub>-markiertem Ubiquitin ko-transfiziert. Im anschließenden Flag-Pulldown von EB1 konnten mit dem EB1-, als auch mit dem Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper hochmolekulare Konjugate von EB1 nachgewiesen werden (Abb. 24). Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um ubiquitinierte EB1-Spezies.

Die Ubiquitinierung von EB1 setzte die Existenz einer Ubiquitin-Ligase voraus. Da der Abbau von EB1 über das CSN reguliert wurde, war die Beteiligung einer Cullin-RING-Ubiquitin-Ligase wahrscheinlich. Diese sollte in Pulldown-Experimenten näher charakterisiert werden. Dazu wurde rekombinant hergestelltes GST-EB1 in HeLa-Lysat inkubiert. Der anschließende GST-Pulldown wurde auf Bestandteile von CRLs untersucht. In Pulldown von GST-EB1 aus Zelllysate konnte Cullin3 als Bestandteil einer Ubiquitin-Ligase nachgewiesen werden (Abb. 25). Cullin1 und Cullin4 konnten in demselben Versuch nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



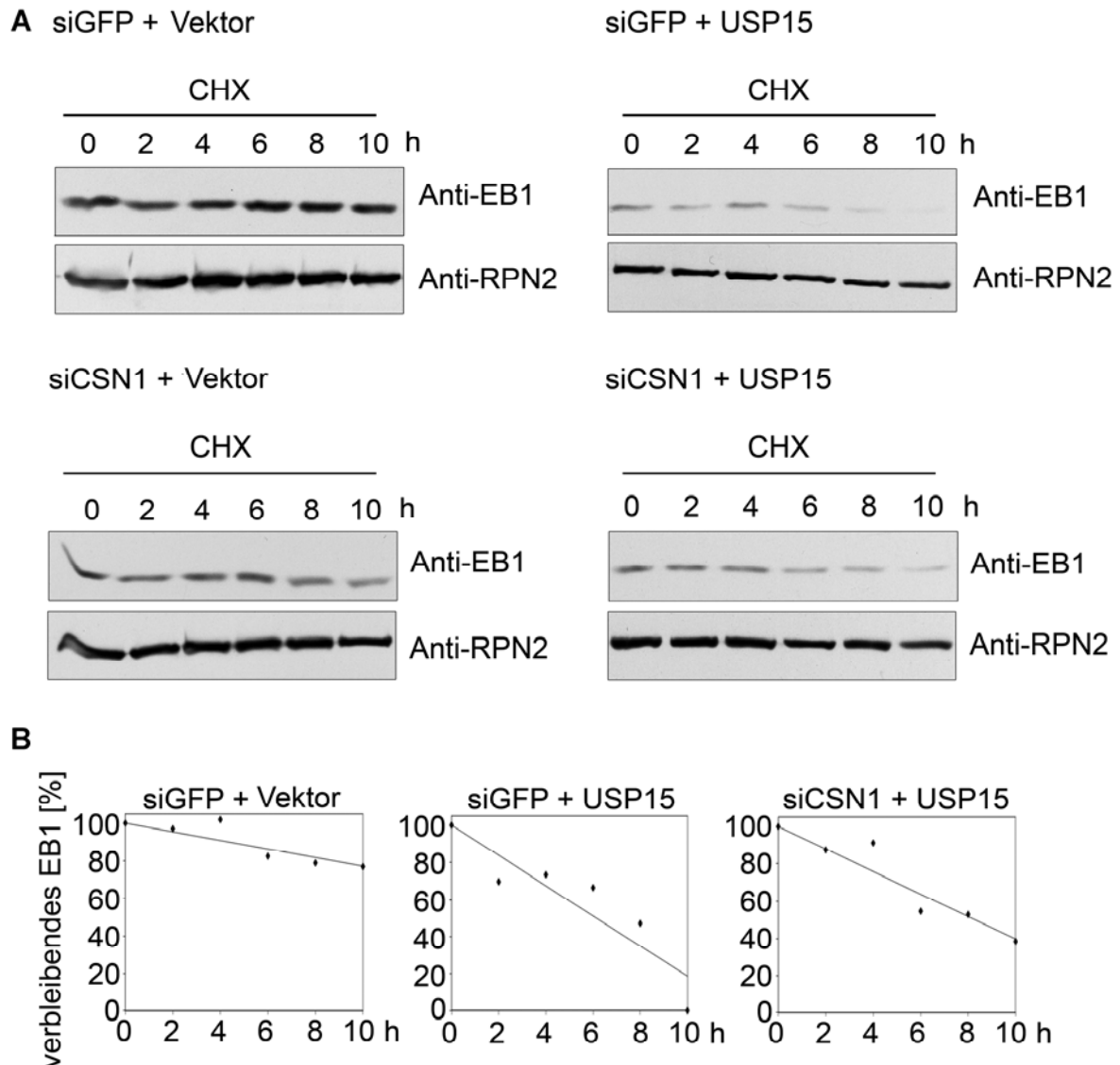
**Abb. 31: Cullin3 ist Bestandteil einer Ubiquitin-Ligase von EB1**

Rekombinant hergestelltes GST-EB1 wurde in Lysat von  $3 \times 10^7$  HeLa-Zellen inkubiert. Danach wurde EB1 mittels GSH-Agarose präzipitiert und das Präzipitat mittels Western-Blot auf die Präsenz von Cullin 3 untersucht. Als Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit GST alleine verwendet.

### 3.2.9. Beschleunigung des Abbaus von EB1 durch USP15

Knockdowns des CSN mit siRNA führten zu einer Verminderung der Gesamtaktivität des CSN in siCSN1- und siCSN3-Zellen. Dies führte zum beschleunigten Abbau von EB1. Der Einfluss der verschiedenen Aktivitäten des CSN auf den Abbau von EB1 wurde getrennt untersucht. Die Deubiquitinierungsaktivität des CSN wurde durch das assoziierte Protein USP15 bereitgestellt. Der Abbau von EB1 wurde deshalb nach

Transfektion von USP15 untersucht (Abb. 32). Dazu wurden siGFP- und siCSN1-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion für zehn Stunden mit Cycloheximid behandelt und der Abbau von EB1 mittels Western-Blot verfolgt. Die Transfektion von USP15 führte zu einem stark beschleunigten Abbau von EB1. Dieser Effekt fiel in siCSN1- weniger stark aus als in siGFP-Zellen.

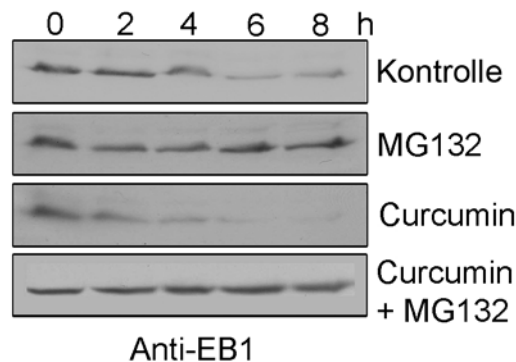


**Abb. 32: Einfluss von USP15 auf den Abbau von EB1**

Durch Transfektion von siGFP- und siCSN1-Zellen mit USP15 wurde deren Effekt auf den Abbau von EB1 untersucht (A). Es wurden Cycloheximid-Chases über einen Zeitraum von zehn Stunden durchgeführt. Die Zeitpunkte wurden mittels Western-Blot auf die Proteolyse von EB1 mittels Anti-EB1-Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle wurde RPN2 verwendet. Die Versuche aus (A) wurden densitometrisch analysiert und eine graphische Darstellung des Abbaus von EB1 erstellt (B).

### 3.2.10. Stabilisierung von EB1 durch Phosphorylierung durch das CSN

Der Einfluss von Phosphorylierungen durch CSN-assoziierte Kinasen auf den EB1 Abbau wurde *in vitro* mit rekombinantem GST-EB1 untersucht (Abb. 23). Dabei wurde HeLa-Lysat als Quelle des UPS verwendet, das mit einem ATP-regenerierendem System komplementiert wurde. Um eine eventuelle Limitation von Ub im *in vitro*-Abbau zu vermeiden, wurde Ub zu dem Reaktionsansatz gegeben. In diesem Versuchsaufbau war EB1 nach etwa 6 - 8 Stunden zur Hälfte abgebaut. Der Abbau konnte durch Zugabe von MG132, einem Proteasominhibitor, verhindert werden. Der Kinaseinhibitor Curcumin führte zu einem stark beschleunigten Abbau von EB1, der ebenfalls durch MG132 hemmbar war. Dies bestätigte die Annahme eines proteasomalen Abbaus.



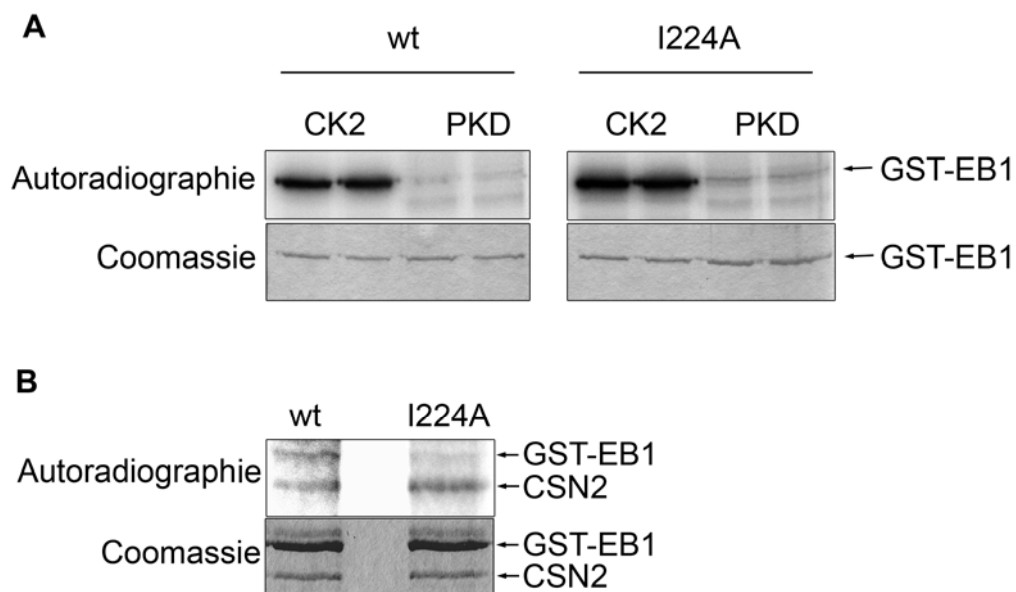
**Abb. 33: *In vitro* Abbau von GST-EB1 in HeLa-Zelllysate**

GST-EB1 wurde in HeLa-Lysat gegeben, das mit einem ATP-regenerierenden System komplementiert wurde. Für einen Zeitraum von acht Stunden wurden Proben entnommen und mittels Western Blot auf den Abbau von EB1 untersucht. Die Effekte des Proteasominhibitors MG132 und des Kinaseinhibitors Curcumin auf den Abbau wurden ebenfalls untersucht. Im Kontrollansatz wurde DMSO eingesetzt.

Der Effekt von Curcumin auf den Abbau von EB1 ließ auf eine Stabilisierung von EB1 durch Phosphorylierung schließen. Zur Überprüfung, ob EB1 ein Substrat für die CSN-assoziierten Kinasen ist, wurden *in vitro* Phosphorylierung mit den Kinasen CK2 und PKD, oder dem aufgereinigten CSN-Komplex durchgeführt. Es konnte eine Phosphorylierung durch die rekombinanten Kinasen CK2 und PKD (siehe Abb. 34 A), sowie durch das CSN nachgewiesen werden (siehe Abb. 34 B). Die Phosphorylierung erfolgte vor allem durch die CK2. Die PKD phosphorylierte EB1 an T205, dies hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Proteolyse von EB1 (Daten nicht gezeigt).



Eine verminderte Bindung von EB1I224A an das CSN *in vitro* und der beschleunigte Abbau in HeLa-Zellen ließen auf eine verringerte Phosphorylierung von EB1I224A durch das CSN schließen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde EB1I224A in einer *in vitro*-Phosphorylierung als Substrat für die CSN-assoziierten Kinasen CK2, PKD (Abb. 34 A) oder das aufgereinigte CSN verwendet (Abb. 34 B). In diesen Experimenten konnte kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung durch die rekombinante CK2 oder PKD festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde EB1I224A durch das aufgereinigte CSN weniger stark phosphoryliert als der Wildtyp.

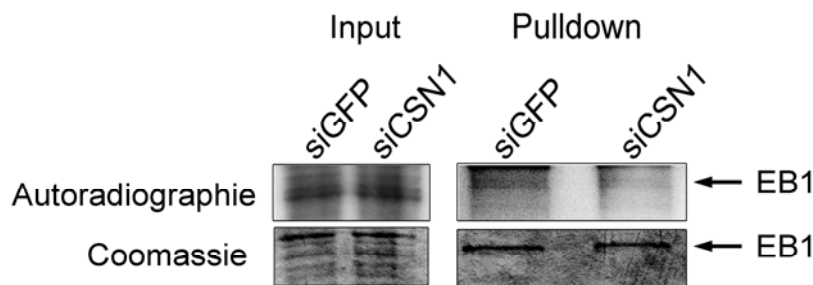


**Abb. 34: Phosphorylierung von EB1I224A *in vitro***

Rekombinant hergestelltes GST-EB1I224A wurde *in vitro* mit den Kinasen CK2 und PKD (A) oder mit dem aufgereinigtem CSN-Komplex (B) in Gegenwart von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP inkubiert. Die Phosphorylierung wurde mittels der Autoradiographie detektiert, als Ladekontrolle diente die Coomassiefärbung. Als Kontrolle für die Phosphorylierung wurde jeweils EB1wt verwendet.

Die Phosphorylierung von EB1 durch den CSN-Komplex, die beschleunigte Proteolyse von EB1 in siCSN-Zellen und der Effekt des Kinaseinhibitors Curcumin ließen vermuten, dass die CSN-assoziierten Kinasen einen wesentlichen Einfluss auf den Abbau von EB1 haben. Der beschleunigte Abbau von EB1 siCSN1- und siCSN3-Zellen könnten durch eine verminderte Phosphorylierung von EB1 in diesen Zelllinien verursacht werden. Die Phosphorylierung von EB1 *in vivo* wurde deshalb durch ein Phospholabeling in siGFP- und siCSN-Zellen untersucht (Abb. 34). Dazu wurden diese zuerst mit His<sub>6</sub>-markiertem EB1 transfiziert und 24 Stunden nach der

Transfektion mit [ $^{32}\text{P}$ ]Orthophosphat markiert. Nach 90 Minuten Markierung wurden die Zellen lysiert und EB1 mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Der Steady-State Status der Phosphorylierung wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Dabei wurden gleiche Mengen an präzipitiertem EB1 aufgetragen. In siCSN1-Zellen schien eine verminderte Phosphorylierung von EB1 im Vergleich mit siGFP-Zellen vorzuliegen.



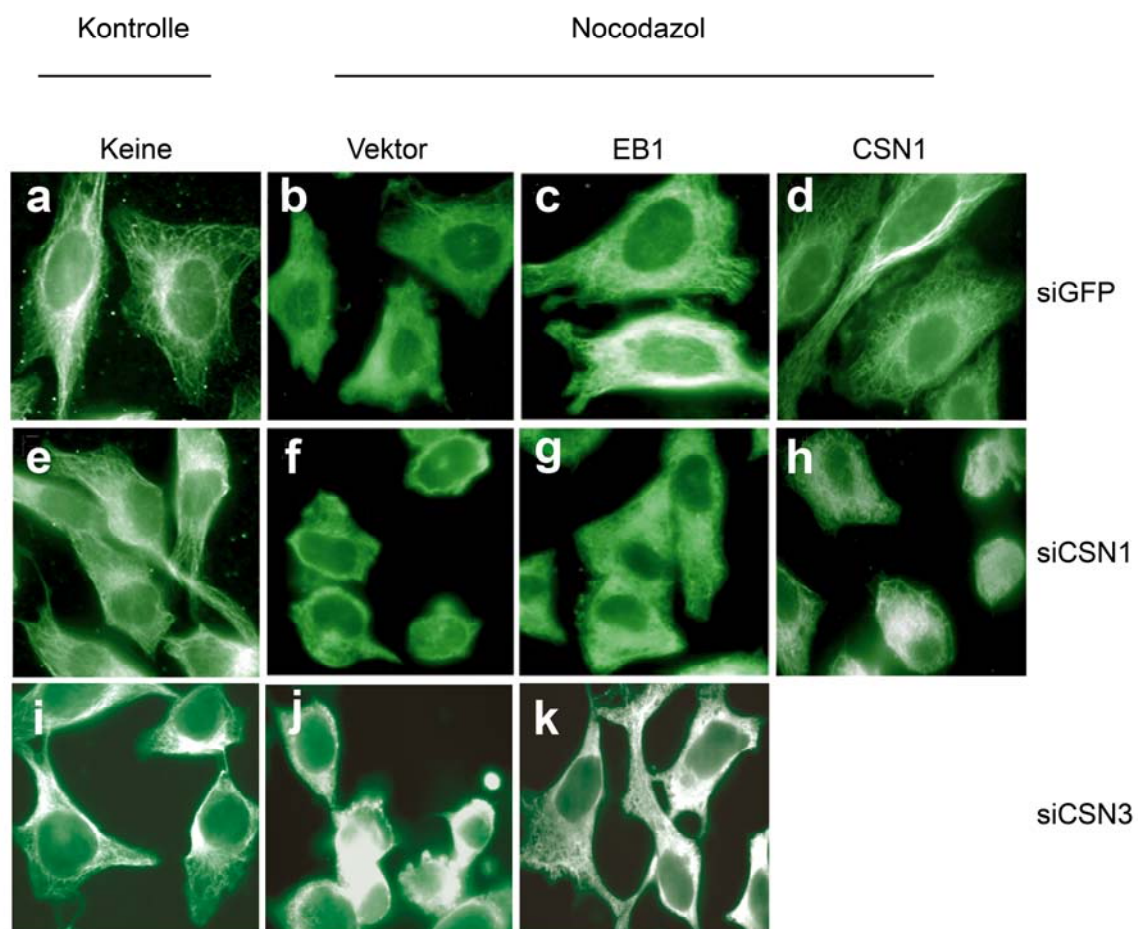
**Abb. 35: *In vivo*-Phosphorylierung von EB1 in siGFP- und siCSN1-Zellen**

siGFP- und siCSN1-Zellen wurden mit His<sub>6</sub>-markiertem EB1 transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit [ $^{32}\text{P}$ ]Orthophosphat markiert. Aus dem Lysat wurde EB1 mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Gleiche Mengen aus beiden Ansätzen wurden für SDS-PAGE verwendet und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. Das getrocknete Gel wurde auf Röntgenfilmen exponiert.

### 3.3. Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten durch EB1 und das CSN

Diese Daten wiesen auf eine Regulation der Proteolyse von EB1 durch das CSN hin. Die verminderten Mengen an EB1 in siCSN1- und siCSN3-Zellen könnten zu einer beeinträchtigten Funktion der Mikrotubuli in den CSN-Knockdown-Zelllinien führen (Pintard et al., 2003). Das Cytoskelett dieser Zelllinien wurde deshalb mittels Immunofluoreszenz untersucht. Die Färbung der Zellen mittels Anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper zeigte in unbehandelten Zellen keinen offensichtlichen Effekt der CSN-siRNAs auf Mikrotubulifilamente. Um eventuelle funktionelle Defekte zu erkennen, wurden die Zelllinien mit Nocodazol behandelt. Nocodazol hemmte die Polymerisierung von Mikrotubuli, was innerhalb von einer Stunde zum kompletten Zerfall der Mikrotubulifilamente führte (Wissel et al., 2005). Die Zellen wurden für zehn Minuten mit Nocodazol behandelt und nach  $\beta$ -Tubulin-Färbung mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 36). In den siCSN1- und siCSN3-Zellen war eine höhere Sensitivität gegenüber Nocodazol zu beobachten (Abb. 36 F, J). Diese Zelllinien wiesen einen kompletten Zerfall der Mikrotubuli auf, was mit einem vollständigen Abrunden der Zellform einherging. Die Behandlung führte ebenfalls zur

Abtrennung des Centrosoms vom Zellkern und zur Akkumulation von  $\beta$ -Tubulin unterhalb der Zytoplasmamembran. In den siGFP-Kontrollzellen waren diese Effekte nach zehn Minuten weniger stark ausgeprägt, als in den CSN-Knockdown Zelllinien (Abb. 36 B). Ein Zerfall der Mikrotubuli konnte ebenfalls beobachtet werden. Die HeLa-typische Zellform war aber noch zu erkennen. In siCSN5-Zellen konnte allerdings kein Unterschied zu der Kontrollzelllinie gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Hier zeigte sich eine vergleichbare Kinetik des Zerfalls der Mikrotubulifilamente bei Nocodazolbehandlung.

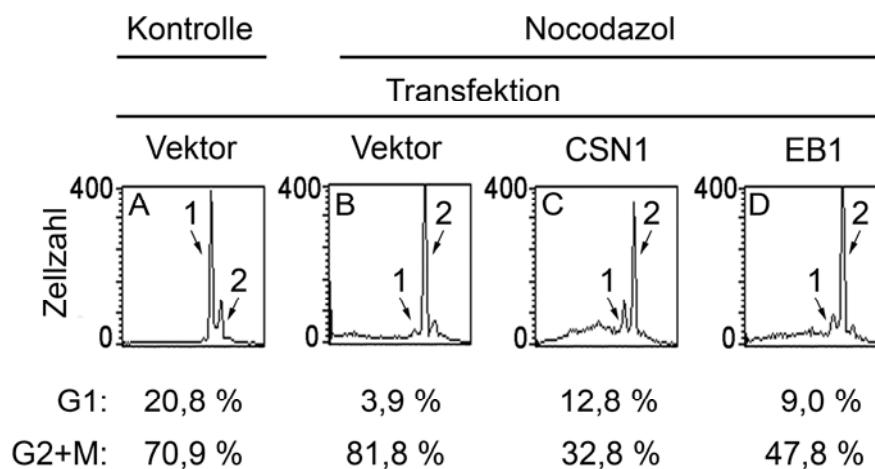


**Abb. 36: Sensitivität von CSN1- und CSN3-siRNA Zellen gegenüber Nocodazol**

Es wurden Immunofluoreszenzen von siGFP- (A - D), siCSN1- (E - H) und siCSN3- Zellen (I-K) mittels  $\beta$ -Tubulin-Antikörper durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für zehn Minuten mit DMSO (Kontrolle: A, E, I) oder Nocodazol behandelt. Durch Transfektion von EB1 (C, G, K), CSN1 (D, H) wurde versucht, dem Effekt von Nocodazol entgegenzuwirken. Als Kontrolle wurde hier der Vektor ohne Insert benutzt (B, F, J). Die Dokumentation erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Die Sensitivität der siCSN1- und siCSN3-Zellen gegenüber Nocodazol sollte nachfolgend durch Transfektionen mit EB1 oder CSN1 aufgehoben werden. Dies sollte eine Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten zur Folge haben. Im Vergleich zur Transfektionskontrolle mit leerem Vektor von siGFP-Zellen (Abb. 36 B) konnte dies auch nachgewiesen werden (Abb. 36 C, D). Hier konnte nach zehn Minuten Nocodazolbehandlung keine wesentliche Inhibition der Mikrotubuli beobachtet werden. In den siCSN1- und siCSN3-Zellen wurden die Nocodazoleffekte ebenfalls durch die Transfektion mit EB1 oder CSN1 abgeschwächt (Abb. 36 G, H, K).

In Abb. 23 C konnte ebenfalls eine Interaktion des CSN mit EB1 während der Zellteilung gezeigt werden. Die Beteiligung von EB1, und möglicherweise auch des CSN, an dem Aufbau des Spindelapparates wurde daher über Zellzyklusanalysen untersucht. Dazu wurde der Spindelcheckpoint in HeLa-Zellen durch Behandlung mit Nocodazol aktiviert (Abb. 35). Dieser verzögerte die Mitose, bis eine Verknüpfung der Chromatiden mit den Mikrotubuli des Spindelapparates erfolgt war.



**Abb. 37: Stabilisierung des Spindelapparates durch EB1 oder CSN1 gegenüber Nocodazol**

HeLa-Zellen wurden mit EB1 (D), CSN1 (C) oder dem Vektor ohne Insert (A + D) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 18 Stunden mit DMSO (Kontrolle, A) oder Nocodazol (B – D) behandelt. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und mit Propidiumjodid gefärbt. In einer FACS-Analyse wurde der Anteil an Zellen in G2+M-Phase (2), sowie G1 (1) bestimmt. Es wurde der prozentuale Anteil der Zellen des jeweiligen Ansatzes für die G1- und G2+M-Phase berechnet.

Es kam dadurch zu einem Arrest der Zellen in der Mitose (Fig. 38 A). Dieser wurde durch FACS-Analysen nach Propidiumjodid-Färbung nachgewiesen. Es konnte ein Anstieg des Anteils der Zellen in der G2+M-Phase nachgewiesen werden (gekennzeichnet durch (2)). Die Blockierung in der Progression der Mitose sollte nun durch die Überexpression von EB1 oder CSN1 gelöst werden. Eine Stabilisierung der Mikrotubuli sollte zu einem Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus führen. Dieser wurde über den Prozentsatz an Zellen mit einfachem DNA-Gehalt nachgewiesen (gekennzeichnet durch (1)) im Vergleich zur Kontroll-Transfektion (Fig. 38 B). Nach der Überexpression von EB1 (Fig. 38 D) verdoppelte sich der Anteil von Zellen in der G1-Phase, bei Transfektion von CSN1 (Fig. 38 C) wurde er etwa verdreifacht. Allerdings führte die Transfektion von CSN1 zu einem hohen Anteil von Zellen in der Sub-G1-Population. Diese Zellen sind entweder apoptotisch oder nekrotisch, weshalb sie nicht in die Berechnung des Anteils von Zellen in der G1-Phase einbezogen wurden.

#### **4. Diskussion**

##### **4.1. siRNA-Studien mit Untereinheiten des CSN-Komplexes**

###### **4.1.1. Knockdown von CSN1 und CSN3**

Eine systematische Untersuchung der verschiedenen CSN-Untereinheiten mittels siRNA in einem humanen Zellkulturmodell wurde bisher noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untereinheiten CSN1, CSN3 und CSN5 permanent durch siRNAs in HeLa-Zellen herunterreguliert. Transiente Transfektionen der siRNA-Oligos hatten nach 24 oder 48 Stunden keine Effekte auf die Proteinmenge der CSN-Untereinheiten (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte eine Reduktion der jeweiligen Untereinheiten auf Proteinebene nach stabiler Transfektion der siRNA-Oligos nachgewiesen werden (siehe Abb. 12). In den getesteten Klonen wurde eine durchschnittliche Reduktion der CSN-Untereinheiten auf etwa 35% der siGFP-Kontrolle gefunden. Eine dauerhafte Reduktion unterhalb dieses Wertes scheint für die verwendeten Zellen letal zu sein, da keine Klone mit geringerem Gehalt an CSN-Untereinheiten gefunden wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten CSN1- und CSN3-spezifischen siRNAs führten auch zur Reduktion des gesamten CSN-Komplexes (siehe Abb. 13 A + 14 A). Die Spezifität der generierten siRNA-Oligos wurde im Falle von CSN1 durch eine Überexpression mit Xpress-CSN1 untersucht. Durch die Transfektion sollten die Effekte zumindest partiell aufgehoben werden können. Unspezifische Effekte hingegen dürften durch die Überexpression von CSN1 nicht beeinflusst werden. Dies konnte tatsächlich gezeigt werden (siehe Abb. 15). Die Transfektion von CSN1 führte zum Anstieg des CSN, welcher durch die Untereinheit CSN8 nachgewiesen wurde, sowie von EB1. Allerdings konnte nach 48 Stunden nur ein moderater Anstieg an CSN8-Protein beobachtet werden. Dies kann mit einer langsamen Assemblierung und Dynamik im Umsatz des CSN-Komplexes in der Zelle erklärt werden. Hierzu sind bisher allerdings keine Daten vorhanden. Des Weiteren hatte die siRNA gegen CSN3 dieselben Effekte auf den CSN-Komplex wie die CSN1-siRNA. Somit konnte von der Spezifität der verwendeten Oligos ausgegangen werden. Meine Daten bestätigen eine bereits publizierte Arbeit zur siRNA gegen CSN3, welche zur Reduktion des CSN-Komplexes führt (Yoneda-Kato et al., 2005).

Basierend auf diesen Daten kann man schlußfolgern, dass eine koordinierte Assemblierung des CSN-Komplexes existiert und die Synthese der einzelnen Untereinheiten vermutlich einem gemeinsamen Regulationsprozess unterliegt.

#### **4.1.2. Besonderheiten des CSN5-Knockdowns**

Der Knockdown von CSN5 hatte einen anderen Phänotyp, als der von CSN1 oder CSN3. In Dichtegradienten und Nativ-PAGE konnte ein Pool von CSN-Komplexen mit stark reduzierter Menge an CSN5 detektiert werden (siehe Abb. 13B + 14B). Durch den Knockdown von CSN5 entstehen vermutlich CSN-Komplexe, die kein CSN5 mehr enthalten. Im Gegensatz dazu führte der Knockdown von CSN1 oder CSN3 zu einer Reduktion des gesamten CSN (siehe Abb. 13A + 14A). Der Knockdown von CSN5 bewirkt nur den Verlust der Deneddylaseaktivität des CSN, nicht aber der Kinaseaktivität (siehe Abb. 16 + 17). Die Größe des CSN-Komplexes wird durch den Knockdown von CSN5 nicht wesentlich beeinträchtigt.

Die meisten Studien zum Knockdown des CSN fokussieren sich auf die Untereinheit CSN5. CSN5 hat eine sehr hohe Halbwertszeit von über 48 Stunden (Bounpheng et al., 2000). Eine signifikante Reduktion von CSN5 konnte von Tomoda et al. nur durch die zweimalige Transfektion von siRNA-Oligos in einem Abstand von zwölf Stunden erreicht werden (Tomoda et al., 2005). Diese Daten zeigen, dass durch transiente Transfektionen eine effektive Reduktion von CSN-Untereinheiten nur unbefriedigend zu erreichen ist. Nach dem Knockdown von CSN5 sind die restlichen Untereinheiten nicht beeinflusst (Cope und Deshaies, 2006; Groisman et al., 2003; Oron et al., 2002). Dies wurde in *D. melanogaster* genauer untersucht. Es konnte ebenfalls ein CSN-Komplex ohne CSN5 nachgewiesen werden (Oron et al., 2002). Falls eine koordinierte Synthese der CSN-Untereinheiten existiert, nimmt CSN5 eine Sonderstellung ein.

Unabhängige Studien zeigen, dass mit siRNAs gegen eine CSN-Untereinheit die Transkription anderen Untereinheiten nicht beeinflusst (Denti et al., 2006; Ullah et al., 2007). Folglich muss eine koordinierte Synthese der CSN-Untereinheiten während der Translation stattfinden. Zur Regulation der Transkription der CSN-Untereinheiten gibt es bisher nur wenige Daten. In *Aspergillus nidulans* kommt es nach DNA-Schäden zu einem Anstieg der mRNAs von CSN4 und CSN5. Die Transkription der beiden mRNAs erfolgt jedoch zeitlich versetzt (Lima et al., 2005). Diese Daten zeigen

eine unterschiedliche Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene. Zwischen dem Knockdown von CSN-Untereinheiten und dem UV-induzierten Anstieg des CSN existieren Unterschiede. Die Behandlung von *A. nidulans* mit UV-Licht bewirkt eine koordinierte Transkription der mRNAs der CSN-Untereinheiten, während der Knockdown von CSN-Untereinheiten die mRNAs der anderen CSN-Untereinheiten nicht beeinflusst. Hierbei nimmt CSN5 eine Sonderstellung ein.

#### 4.1.3. Pleiotrope Effekte durch Knockdown und Knockout des CSN

Die Reduktion des CSN führt zu einer Reihe von Phänotypen. In höheren Eukaryoten ist der Knockout des CSN letal und es ist nicht möglich, aus den Blastocysten von Mäusen nach dem Knockout von *csn2* Zellkulturlinien herzustellen (Lykke-Andersen et al., 2003). Für *A. thaliana* sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden, Knockouts von CSN-Untereinheiten sind alle keimlingsletal (Dohmann et al., 2005; Gusmaroli et al., 2007). In niederen Eukaryoten wie *A. nidulans* oder *N. crassa* existiert ebenfalls ein CSN-Komplex. In *N. crassa* fehlt die CSN8-Untereinheit und der Knockout von *csn2* ist nicht letal, führt aber zur Destabilisierung von F-Box-Proteinen und Cullinen (He et al., 2005). Dies hat einen verlangsamten Abbau von diversen Substraten zur Folge. In *A. nidulans* ist der Knockout des CSN ebenfalls nicht letal, es findet aber nur noch vegetatives Wachstum statt. Die Ausbildung der Fruchtkörper im sexuellen Zyklus ist durch den CSN-Knockout gestört (Busch et al., 2003). Der Knockout von CSN-Untereinheiten in *S. pombe* oder *S. cerevisiae* ist ebenfalls nicht letal und die Zellen zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Der Knockout von *csn1* jedoch führt in *S. pombe* zu einer verlangsamten S-Phase (Liu et al., 2003). Der Knockdown von CSN-Untereinheiten in *D. melanogaster* hat ebenfalls eine Retention von Zellen in der G1-Phase zur Folge (Bjorklund et al., 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Knockout des CSN in höheren Eukaryoten einen Arrest der Differenzierungsvorgänge während der Entwicklung hervorruft. Aus den Daten kann außerdem auf eine Beteiligung des CSN am Fortschreiten des Zellzyklus geschlossen werden. Die genauen Mechanismen, wie das CSN in die Regulation des Zellzyklus eingreift, sind jedoch noch unklar. Dies könnte über die reduzierte Synthese von Nukleotiden (Liu et al., 2003) oder durch den verlangsamten Abbau von Zellzyklusregulatoren wie p27 (unveröffentlichte Daten von C. Berndt) erklärt werden. In den siCSN1-Zellen, welche in dieser Arbeit



hergestellt wurden, konnte ebenfalls eine Verlängerung des Zellzyklus von 24 Stunden der siGFP-Kontrolle auf etwa 30 Stunden beobachtet werden (unveröffentlichte Daten von B. Hetfeld). Eine Verzögerung in der Cytokinese als Ursache wäre ebenfalls denkbar. Dabei könnte EB1 beteiligt sein. Die Interaktion zwischen EB1 und p150<sup>Glued</sup> ist für die Cytokinese notwendig (Strickland et al., 2005). Der CSN1- und CSN3-Knockdown verringerte die Mengen an EB1 (siehe Abb. 12 A), so dass diese Interaktion beeinträchtigt sein könnte. Möglicherweise trägt das zur Verlängerung des Zellzyklus bei.

#### 4.1.3.1. Effekte der CSN-siRNA auf CRLs

Der Knockout von CSN-Untereinheiten führt zur Destabilisierung von Cullinen (Gusmaroli et al., 2007; He et al., 2005; Wu et al., 2005). Dabei betrifft die Destabilisierung von Cullinen in *N. crassa* sowohl die neddylierte als auch die deneddylierte Form (He et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch in den siCSN-Zellen kein Effekt auf die Stabilität von Cullin 1, 3 und 4 beobachtet werden (siehe Abb. 18). Dies kann an der Effektivität des Knockdowns des CSN gelegen haben. Für die Destabilisierung der Culline ist eine vollständige Reduktion von CSN5 notwendig (Wu et al., 2005). Dies konnte mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht erreicht werden. Eine Destabilisierung von F-Box-Proteinen konnte jedoch schon nach dem unvollständigen Knockdown von CSN5 nachgewiesen werden (Cope und Deshaies, 2006; Denti et al., 2006).

BTB-Proteine, welche die Substraterkennung von Cullin3-haltigen CRLs vermitteln, werden durch Ubp12p stabilisiert (Wee et al., 2005; Zhou et al., 2003). Es besteht ein funktioneller Zusammenhang von USP15 oder Ubp12p in *S. pombe* und dem CSN. So ist das CSN für den Transport von Ubp12p in den Zellkern notwendig (Zhou et al., 2003). Des Weiteren wird Rbx1, das RING-Finger-Protein von CRLs, durch USP15 deubiquitiniert und so vor Autoubiquitinierung und Abbau geschützt (Hetfeld et al., 2005). Die Bindungsstellen für USP15 an den CSN-Komplex befinden sich an CSN5 und CSN7 (Hetfeld et al., 2005). Die in dieser Arbeit beobachtete Destabilisierung von Rbx1 wird vermutlich durch eine Beeinträchtigung der Funktion von USP15 nach dem Knockdown des CSN verursacht. Dies kann einen verstärkten Abbau von Rbx1 durch Autoubiquitinierung bewirken (Hetfeld et al., 2005). In den siCSN5-Zellen fiel dieser Effekt jedoch am schwächsten aus. Dies könnte über die Existenz des

Restkomplexes erklärt werden. An diesen kann USP15 noch über CSN7 binden, weshalb die Interaktion mit dem CSN nur partiell gestört sein dürfte.

Da USP15 und das CSN in einer Epistasisgruppe agieren (Zhou et al., 2003), hat die Inhibition von USP15 oder des CSN dieselben Effekte auf CRLs. Der gleichzeitige Knockdown des CSN und von USP15 hat vermutlich keinen zusätzlichen Effekt. Die Stabilisierung von CRLs durch USP15 wird durch den Effekt der Überexpression von USP15 auf die Proteolyse von EB1 bestätigt (siehe Abb. 32). In siGFP-Zellen führte dies zum schnellen Abbau von EB1, welcher jedoch in siCSN1-Zellen etwas langsamer ausfiel. Die Überexpression von USP15 geht wahrscheinlich mit einer verstärkten Assoziation von USP15 mit dem CSN einher, das gleichzeitig ein CRL gebunden hat. Dies könnte zur Stabilisierung des Substratadaptors von EB1 und von Rbx1 führen, was einen effizienteren Abbau zur Folge hätte.

#### **4.1.3.2. Effekte der CSN-siRNA auf die Phosphorylierung von Substraten**

Der Komplex aus siGFP- und siCSN5-Zellen zeigte eine unverminderte Autophosphorylierung von CSN2 und CSN7. Die Bindung der Kinasen erfolgt über die Untereinheiten CSN3 und CSN7 an das CSN (Uhle et al., 2003). Somit war die Bindung von CK2 und PKD durch den Knockdown von CSN5 nicht beeinträchtigt. Der Komplex aus beiden Zelllinien wurde eingesetzt, um c-Jun oder p27 zu phosphorylieren. Diese Substrate binden über CSN5 an das CSN (Naumann et al., 1999; Tomoda et al., 1999). Der aus siCSN5-Zellen präzipitierte Komplex zeigte eine reduzierte Kinaseaktivität gegenüber den Substraten (siehe Abb. 20 A +B). Dies verdeutlicht die besondere Funktion von CSN5 als Substratrezeptor des CSN. Das CSN bildet die Plattform für die Phosphorylierungen von Substraten, die an CSN5 binden. Daher ist anzunehmen, dass die Substratspezifität von CK2 und PKD partiell durch das CSN reguliert wird. Dies ist für ein weiteres CSN5-bindendes Protein, 53BP1, gezeigt. Nach dem Knockdown von CSN5 konnte eine reduzierte Phosphorylierung von 53BP1 nachgewiesen werden (Kwak et al., 2005). Diese Daten zeigen, dass die Phosphorylierung von Substraten durch das CSN kontrolliert werden kann. Dazu ist die Bindung der Substrate an CSN5 notwendig. Das CSN bildet in diesem Komplex die Plattform für die Bindung von Kinasen und Substraten.

#### 4.1.3.3. CSN-siRNA-Studien zum Abbau von c-Jun

Es wurden die Effekte der CSN-siRNAs auf den Abbau von c-Jun als Modells substrat untersucht. Die Interaktionen mit dem CSN-Komplex wird über CSN5 vermittelt (Naumann et al., 1999; Uhle et al., 2003), was in einer Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen resultiert, die zur Stabilisierung von c-Jun führt. Es konnte in jeder der drei CSN-siRNA-Zelllinien ein beschleunigter Abbau von c-Jun beobachtet werden (siehe Abb. 19). Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Menge an c-Jun im Steady-State. Trotz des schnellen Abbaus in siCSN1- und siCSN3-Zellen war die beschleunigte Proteolyse nur in Anwesenheit von CHX sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die Zellen waren somit in der Lage durch eine erhöhte Expression von c-Jun den verstärkten Abbau auszugleichen. Ein ähnlicher Effekt konnte von He et al. für den Abbau der Culline gezeigt werden. Diese weisen im Wildtyp und *csn2*-Knockout keine Unterschiede im Steady-State auf, obwohl ein CHX-Chase einen schnelleren Abbau offenbarte (He et al., 2005).

Durch die Transfektion von CSN5 in siCSN5-Zellen wurde versucht, den Effekt der CSN5-siRNA auf den Abbau von c-Jun wieder aufzuheben (siehe Abb. 19 B). Dies konnte durch Wildtyp-CSN5 aber auch mit einer deneddylierungsdefizienten Mutante (D151N) erreicht werden (siehe Abb. 19 B + C). Der beobachtete Effekt auf den Abbau von c-Jun beruht folglich nicht auf der Isopeptidaseaktivität des CSN. Die Transfektion von CSN5 führt nicht zur *de novo* Assemblierung des CSN-Komplexes (Naumann et al., 1999). Dadurch war der Unterschied zwischen den siCSN5- und siCSN1-Zellen nach Transfektion von CSN5 im Abbau von c-Jun zu erklären. Die siCSN1-Zellen zeigten keine Veränderung in der Stabilität von c-Jun nach der Transfektion von CSN5, da hier der Phänotyp auf der Reduktion des gesamten CSN beruhte. Die Transfektion von CSN5 alleine konnte c-Jun nicht stabilisieren, da das gesamte CSN als Plattform für die Phosphorylierung notwendig ist (siehe Abb. 19 C). Die CSN-siRNA-Experimente konnten die existierenden Daten zum Abbau von c-Jun bestätigen. Der Transkriptionsfaktor c-Jun bindet via CSN5 an den CSN-Komplex und wird durch die resultierende Phosphorylierung stabilisiert. Die Phosphorylierung und Stabilisierung ist direkt proportional zu der zellulären Menge an CSN-Komplex.

## **4.2. Das CSN kontrolliert die Stabilität von EB1**

### **4.2.1. Interaktion von EB1 mit dem CSN**

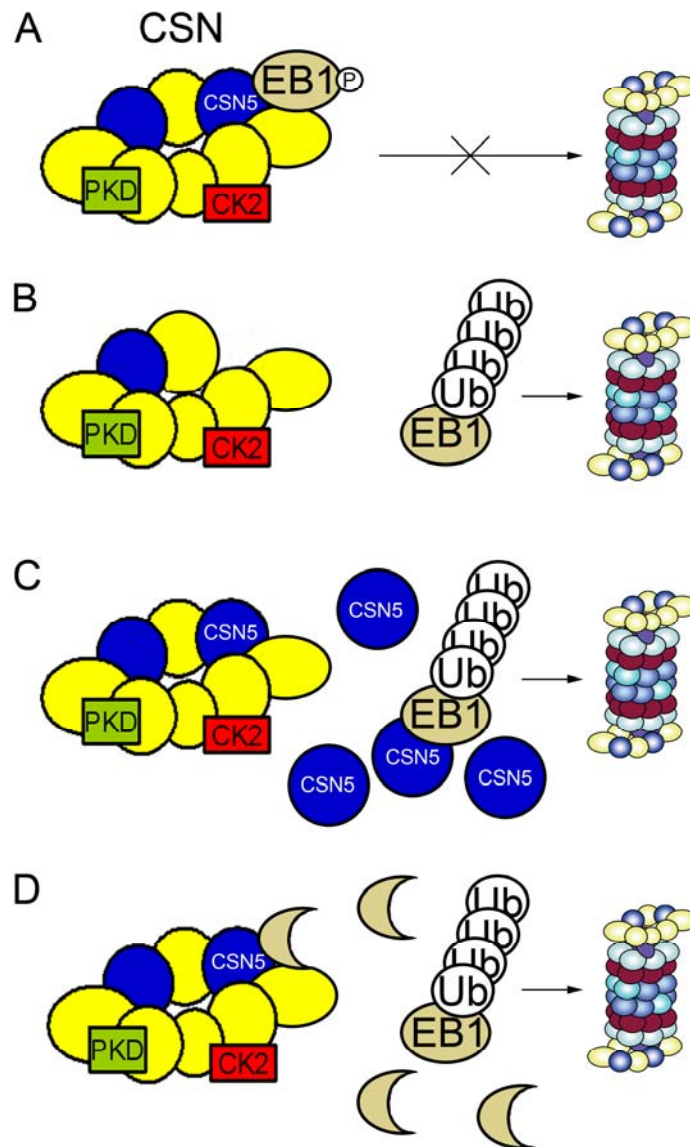
In dieser Arbeit wurde eine neue Interaktion des CSN mit dem EB1 Protein charakterisiert. Die Bindung von EB1 wird ebenfalls über CSN5 vermittelt (siehe Abb. 25). Für eine große Zahl von proteasomalen Substraten, deren Abbau das CSN reguliert, konnte eine Bindung an CSN5 nachgewiesen werden (Bech-Otschir et al., 2005). Bisher ist in diesen Proteinen kein gemeinsames Interaktionsmotiv für die Bindung an CSN5 gefunden worden. Die Bindung von EB1 an das CSN scheint recht fest zu sein, da sie noch nach der Aufreinigung des CSN aus Erythrozyten nachweisbar ist (siehe Abb. 21). Im Laufe der Präparation fällt jedoch ein Teil des EB1 vom CSN ab, dies ist besonders im zweiten Schritt, dem Glycerolgradienten (siehe Abb. 21 B), deutlich. Hier befindet sich ein Großteil von EB1 in Fraktionen niedrigerer Dichte als das CSN. Durch die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen gebundenem und freiem EB1 auf jeder Stufe der Aufreinigung kommt es schrittweise zu dem Verlust eines Großteils von EB1. Ebenfalls konnte in der Immunopräzipitation nur ein Teil des zellulären EB1 mit dem CSN ko-präzipitiert werden (siehe Abb. 22), was ein Hinweis darauf ist, dass EB1 in freier Form oder in anderen Komplexen vorkommt.

Diese Versuche sind noch kein Nachweis für eine direkte Interaktion der Proteine, weshalb *in vitro* die Bindung von EB1 an das CSN untersucht wurde (siehe Abb. 24). Es konnte sowohl eine Bindung an das aufgereinigte CSN, als auch an die rekombinant hergestellte Untereinheit CSN5 gezeigt werden (siehe Abb. 25). Diese Daten zeigen, dass in der Zelle ein Teil von EB1 mit dem CSN assoziiert vorliegt.

### **4.2.2. Die CSN5-vermittelte Bindung an das CSN stabilisiert EB1**

Die Bindung von EB1 an das CSN wird über die Untereinheit CSN5 vermittelt (siehe Abb. 25 + 26). Die Eingrenzung der Bindungsstellen von EB1 an das CSN erfolgte über die Generierung von Fragmenten. Die dominante Rolle des C-Terminus von EB1 wurde in einem Konkurrenzexperiment identifiziert. Es konnte eine vollständige Verdrängung von EB1 durch das C-terminale Fragment gezeigt werden (siehe Abb. 27 A). Die Überexpression dieses Fragmentes bewirkte in Zellen auch den Abbau des endogenen EB1 (siehe Abb. 27 B). Interessanterweise führte eine

Expression von großen Mengen des C-Terminus zum Absterben der Zellen, während der Knockdown von EB1 selber nicht letal ist (Kita et al., 2006; Louie et al., 2004). Die Expression des C-Terminus von EB1 könnte weitere Effekte in der Zelle ausgelöst haben.



**Abb. 38: Modell zum Einfluss von CSN5 auf den Abbau von EB1**

Die Bindung von EB1 an das CSN über die Untereinheit CSN5 führt zu dessen Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen. Dadurch wird EB1 gegenüber dem Abbau durch das Proteasom stabilisiert (A). Ein CSN-Komplex ohne CSN5 ist nicht in der Lage, EB1 zu binden, was dessen Abbau beschleunigt (B). Eine Überexpression von CSN5 verhindert die Bindung von EB1 an den CSN-Komplex. Die Bindung von EB1 an freies CSN5 hat keinen stabilisierenden Effekt (C). Die Überexpression eines C-terminalen Fragmentes von EB1 verhindert dessen Bindung an CSN5 und führt zur Proteolyse von EB1 (D).

Die Inhibition der Polymerisierung oder Depolymerisierung von Mikrotubuli führt zur Apoptose (Sherwood et al., 1994; Woods et al., 1995). Die Expression des C-Terminus von EB1 könnte neben der Interaktion mit dem CSN auch die Interaktionen von EB1 mit anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beeinflussen, was das Absterben der Zellen nach der Transfektion des C-terminalen Fragmentes von EB1 erklären würde. Basierend auf diesen Daten wurde davon ausgegangen, dass die Bindung von EB1 an das CSN durch den C-Terminus vermittelt wird. Dieser beinhaltet ebenfalls die Phosphorylierungsstellen von EB1, was durch die Phosphorylierung des C-terminalen Fragmentes durch das CSN nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu wurde der N-Terminus von EB1 nur geringfügig oder gar nicht durch das CSN phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Die exakte Funktion der CSN-vermittelten Phosphorylierung von EB1 ist jedoch noch nicht geklärt.

Der C-Terminus von EB1 enthält auch eine Dimerisierungsdomäne von EB1. Das Protein liegt in nativer Konformation als Dimer vor, welches *in vitro* spontan gebildet wird. Die Dimerisierung von EB1 vermittelt die Bindung an seine Interaktionspartner (Honnappa et al., 2005; Slep et al., 2005). Die Interaktion mit dem CSN scheint hiervon auch betroffen zu sein. Die Mutation von EB1I224A führt zum Verlust der Fähigkeit zur Dimerisierung und gleichzeitig der Bindung an das CSN (siehe Abb. 28 A). Inwiefern die Dimerisierung von EB1 zu dessen Regulation beiträgt, ist noch nicht geklärt. Es wäre denkbar, dass Kinasen oder Interaktionspartner die Dimerisierung von EB1 beeinflussen und so die Stabilität und Aktivität von EB1 regulieren. Es wurde bisher gezeigt, dass CLIP170 durch seine Bindung an EB1 dessen Struktur verändert. Dadurch wurde die CH-Domäne exponiert, und EB1 konnte an Mikrotubulifilamente binden (Hayashi et al., 2005). Ein analoges Schema für andere Bindungen oder posttranslationale Modifikationen wäre auch denkbar.

Eine Überexpression von CSN5, der Bindungsstelle von EB1 an den CSN-Komplex, führte zur Destabilisierung von EB1. Diese war abhängig von der Menge an transfiziertem CSN5 (siehe Abb. 26 B). Das CSN5 liegt nach der Transfektion vorwiegend in freier Form vor (Naumann et al., 1999). Durch dessen Bindung von Substraten verhindert es deren Interaktion mit dem CSN-Komplex. Dies konnte durch ein Konkurrenzexperiment mit rekombinantem CSN5 und dem CSN-Komplex um die Bindung von EB1 *in vitro* gezeigt werden. Die Bindung von EB1 an den CSN-Komplex konnte durch die Zugabe von rekombinantem CSN5 reduziert werden

(siehe Abb. 19A). Diese Konkurrenz verdeutlicht außerdem die in Abb. 25 A + B gezeigte Bindung von EB1 an das CSN. Interessanterweise ist ein hoher molarer Überschuss an freiem CSN5 nötig, um die Interaktion des Komplexes mit den Substraten zu verhindern. Dies führt zur Annahme, dass die Affinität des komplexgebundenen CSN5 zu EB1 höher ist, als für das freie CSN5. Das in den Komplex integrierte CSN5 ist katalytisch aktiv, das freie hingegen nicht, was eine Konformationsänderung nahelegt (Cope et al., 2002). Möglicherweise wird durch die Konformationsänderung des CSN5 im Komplex auch die Bindung der Substratproteine beeinflusst.

#### **4.2.3. Phosphorylierung von EB1 durch das CSN**

Die Bindung von EB1 an das CSN resultiert in dessen Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen (siehe Abb. 34). Eine Phosphorylierung von EB1 wurde bisher noch nicht beschrieben, über eine mögliche Phosphorylierung durch CK1 oder CK2 wurde jedoch spekuliert (Hayashi und Ikura, 2003). Eine Phosphorylierung durch die CK2, aber auch durch PKD, konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* gezeigt werden (siehe Abb. 34). Interessanterweise waren mit rekombinanten Kinasen keine Unterschiede in der Phosphorylierung von EB1wt und EB1I224A nachweisbar (siehe Abb. 34 A). Die Dimerisierungsmutante von EB1 hingegen wurde durch den CSN-Komplex weniger stark phosphoryliert (siehe Abb. 34 B). Dies zeigte, dass die CSN-assoziierten Kinasen eine andere Substratspezifität haben als die freien. Dies konnte in den Versuchen zur Phosphorylierung von c-Jun und p27 mit dem CSN-Komplex von siCSN5-Zellen bestätigt werden. Diese Substrate werden nach der Entfernung der Bindungsstelle durch das CSN nicht mehr phosphoryliert. Der Abbau von EB1 wurde durch den Kinasehemmstoff Curcumin (siehe Abb. 33) *in vitro* beschleunigt. Folglich schien eine Phosphorylierung die Stabilisierung von EB1 zu bewirken. Dies könnte direkt durch die Phosphorylierung von EB1 oder indirekt durch Phosphorylierungen von CRLs bedingt sein. Des Weiteren ist Curcumin kein spezifischer Inhibitor für die CSN-assoziierten Kinasen, sondern führte auch zu einer Vielzahl von weiteren Effekten (Gupta et al., 2006; Si et al., 2007). Es wurden deshalb *in vivo*-Markierungen von EB1 mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat (siehe Abb. 35) durchgeführt. In siCSN1-Zellen war eine verminderte Phosphorylierung nachweisbar, was eine signifikante Beschleunigung des Abbaus von EB1 zur Folge

hatte. Daher kann auf eine Stabilisierung von EB1 gegenüber dem UPS durch die CSN-vermittelte Phosphorylierung geschlossen werden.

#### **4.2.4. Lokalisation der Interaktion von EB1 mit dem CSN in Zellen**

Die Ko-Lokalisationsstudien mittels Konfokaler Laserscan Mikroskopie (KLSM) von EB1 und dem CSN in HeLa-Zellen zeigen eine partielle Überlagerung der Färbungen (siehe Abb. 23 A + C). Dazu wurden zwei verschiedene Anti-EB1-Antikörper und gegen zwei unterschiedliche Untereinheiten des CSN gerichtete Antikörper verwendet, um unspezifische Färbungen in der Immunofluoreszenz auszuschließen. Es kann mit den Kombinationen der verschiedenen Antikörper jeweils die Ko-Lokalisation in der Nähe des Kerns gezeigt werden. Diese Interaktion findet sehr wahrscheinlich im Centrosom statt, welches EB1 enthält (Louie et al., 2004). Eine Interaktion von EB1 mit dem CSN an den (+)-Enden der Mikrotubuli konnte nicht gezeigt werden. Mit den KLSM-Daten konnte eine Lokalisation des CSN im Centrosom nachgewiesen werden (siehe Abb. 23 B). Im Centrosom ist nur ein Teil von EB1 lokalisiert (Musa et al., 2003), was die niedrigen Mengen von EB1 in der Ko-Immunopräzipitation mit dem CSN erklären könnte. Die Lokalisation des CSN im Centrosom ist sehr wahrscheinlich, da das Proteasom und Komponenten des UPS hier bereits nachgewiesen wurden (Freed et al., 1999; Wigley et al., 1999). Die Interaktion des CSN mit dem Proteasom und seine Schlüsselstellung im Ubiquitin-abhängigen Abbau durch die Regulation der Ubiquitinierung durch CRLs, ließen die Lokalisation des CSN im Centrosom daher plausibel erscheinen. Die zelluläre Verteilung des CSN ist bisher als primär nukleär beschrieben (Chamovitz et al., 1996). Es wurde jedoch auch im Cytoplasma nachgewiesen, mit einer Konzentration in der Nähe des Zellkerns (Bounpheng et al., 2000; Seeger et al., 1998). Die in dieser Arbeit angefertigten KLSM-Aufnahmen bestätigen diese Verteilung. Zusätzlich wurde die Lokalisation im Centrosom entdeckt. Das CSN ist primär im Zellkern, aber auch im Cytoplasma zu sehen (siehe Abb. 23 A + B).

Die Interaktion von EB1 mit dem CSN im Centrosom kann die moderaten Effekte auf die Stabilität von EB1 in den CSN-siRNA-Zellen erklären. Der Prozentsatz von EB1, der sich im Centrosom befindet, ist gering (siehe Abb. 23 A). Nach dem Knockdown des CSN kann weniger EB1 durch das CSN im Centrosom gebunden und somit phosphoryliert und stabilisiert werden. Der Pool an EB1, der frei vorliegt, kann

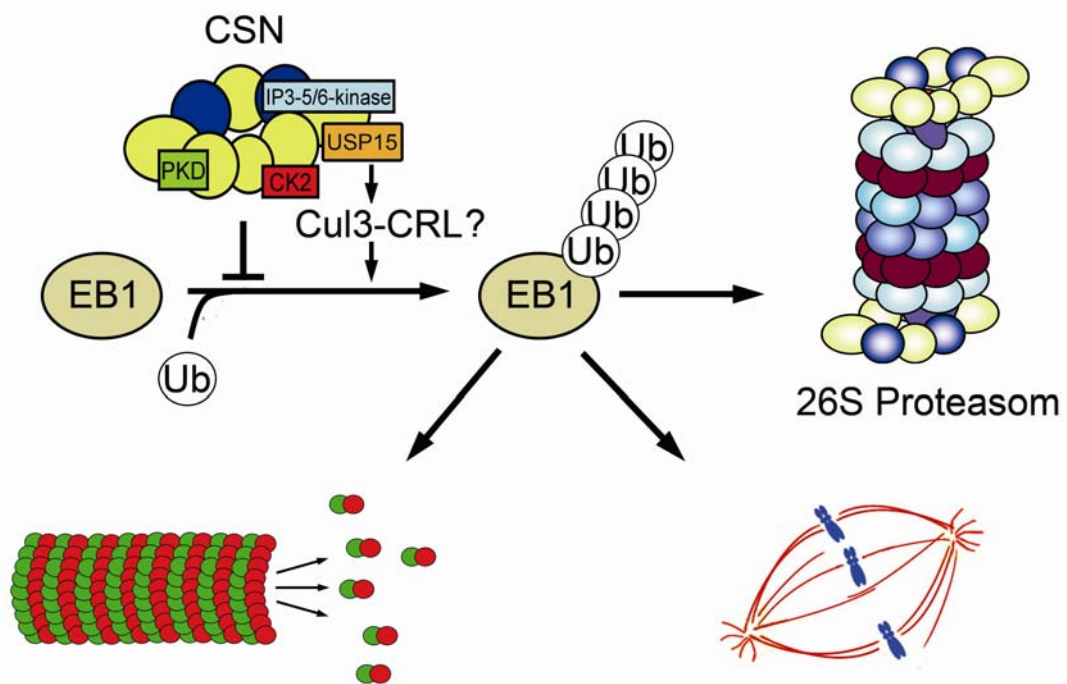


vermutlich durch das Proteasom abgebaut werden. Die Inhibition der Stabilisierung von EB1 durch das CSN mittels siRNA konnte folglich nur geringe Effekte auf den Abbau von EB1 haben, da hiervon nur ein Teil von EB1 direkt betroffen ist. Des Weiteren konnte nur eine Reduktion auf 40% verbleibendes CSN erreicht werden, welches weiterhin EB1 stabilisieren kann.

#### **4.3. Effekte der CSN-siRNA auf Mikrotubulifilamente**

Mikrotubulifilamente gehen in der Zelle vom Centrosom aus. Ohne EB1 ist die Ausbildung von Mikrotubulifilamenten vom Centrosom beeinträchtigt (Louie et al., 2004). Durch den Knockdown des CSN ist anzunehmen, dass weniger EB1 im Centrosom zur Verfügung steht, da es dort nicht mehr durch das CSN stabilisiert werden kann. Deshalb war mit Effekten auf die Ausbildung neuer Mikrotubulifilamente vom Centrosom aus zu rechnen. Des Weiteren stabilisiert EB1 Mikrotubulifilamente durch die Bindung an den „lattice seam“. Durch die verminderten Mengen an EB1 im Steady-State nach dem Knockdown von CSN1 oder CSN3 sind labilere Mikrotubulifilamente zu erwarten (Busch und Brunner, 2004; Sandblad et al., 2006). Dies würde in Experimenten zur Bestimmung der Stabilität von Mikrotubuli oder der Reorganisation von Mikrotubulifilamenten nachweisbar sein. Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol ermöglichte es, derartige Effekte zu beobachten. Nocodazol inhibiert die Polymerisierung von Mikrotubulifilamenten und führt so zum Zusammenbruch von Mikrotubulifilamenten. Die Mikrotubulifilamente in siCSN1- und siCSN3-Zellen kollabierten bei Nocodazolbehandlung schneller als in siGFP-Zellen (siehe Abb. 22). Es konnten die von Wissel et al. beschriebenen Effekte des Verlustes der Zellform und der Akkumulation von Tubulin unterhalb der Cytoplasmamembran in siCSN1-Zellen bereits nach zehn Minuten beobachtet werden (Wissel et al., 2005). Diese Effekte wurden durch die zusätzliche Transfektion von CSN1 oder EB1 partiell aufgehoben (siehe Abb. 37 G + H). Dies zeigt, dass entweder durch mehr EB1 oder durch die Stabilisierung des vorhandenen EB1 durch das CSN der Nocodazoleffekt abgeschwächt werden kann. Die Stabilisierung der Mikrotubuli erfolgt demnach primär durch EB1, was seinerseits durch das CSN stabilisiert wird.

Eine Beeinflussung von Mikrotubuli durch das CSN wurde bereits beobachtet. In *C. elegans* führte der Knockdown von CSN-Untereinheiten zu einer generellen fehlerhaften Ausbildung der Mikrotubulifilamente. Dies hat eine Destabilisierung und falsche Ausrichtung des Spindelapparates zur Folge (Pintard et al., 2003). Der Knockdown des CSN verhindert den normalen Abbau von MEI-1/Katanin in diesen Zellen durch eine Cul3-CRL (Pintard et al., 2003). Der Abbau von MEI-1/Katanin ist für die Ausbildung der mitotischen Spindel notwendig (Kurz et al., 2002; Pintard et al., 2003).



Depolymerisierung von Mikrotubuli    Defekte des Spindelapparates

**Abb. 39: Der Abbau von EB1 wird durch das CSN reguliert.**

EB1 wird über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Dies erfolgt nach Polyubiquitinierung, möglicherweise durch eine Cul3-CRL. Geringe zelluläre Mengen von EB1 führen zur Destabilisierung von Mikrotubulifilamenten und Misseggregationen der Chromosomen in der Mitose. Der Abbau wird durch das CSN gesteuert. Eine Phosphorylierung durch die CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD stabilisiert EB1. USP15 beschleunigt den Abbau, wahrscheinlich durch die Stabilisierung der Ub-Ligase für EB1.

In einer unabhängigen Studie wurde gezeigt, dass die CSN-assoziierte Kinase CK2 einen direkten Effekt auf die Ausbildung von Mikrotubulifilamenten hat. Der Knockdown von CK2 führt zur Destabilisierung von Mikrotubuli und erhöht die Sensitivität von Zellen gegenüber Inhibitoren der Mikrotubulipolymerisierung (Lim et

al., 2004). Diese Daten wurden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Neddylierung bzw. Deneddylierung (Pintard et al., 2003) als essentiell für die Regulation der Mikrotubuli beschrieben. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem CSN um einen zentralen Regulator der Mikrotubulifilamente handelt.

Die Interaktion von EB1 mit dem CSN bestand auch während der Zellteilung (siehe Abb. 23 C). Im Vergleich mit Abb. 23 A trat die Überlagerung der beiden Färbungen stärker hervor. Deswegen wurde die Stabilisierung der Mikrotubuli durch EB1 und das CSN auch während der Zellteilung untersucht (siehe Abb. 38). HeLa-Zellen wurden mit Nocodazol in der Mitose arretiert und durch Transfektion wurde versucht, die Blockierung des Zellzyklus wieder aufzuheben. Die Transfektion von EB1 oder CSN1 führte wahrscheinlich zur Stabilisierung des Spindelapparates gegenüber Nocodazol, da in beiden Fällen der Anteil der Zellen in der G1-Phase anstieg. Dabei hatte CSN1 (siehe Abb. 38 C) einen stärkeren Effekt als die Überexpression von EB1 (siehe Abb. 38 D). Dies könnte durch verschiedene Aktivitäten des CSN erklärt werden, welche einen pleiotropen Phänotyp verursachen. Es konnte gezeigt werden, dass das CSN die Zellzyklusprogression begünstigt (Bjorklund et al., 2006), was durch diese Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte. Die Transfektion von CSN1 führte jedoch zu einem hohen Prozentsatz an Zellen in der Sub-G1-Phase (siehe Abb. 38 C), was für ein Absterben der Zellen spricht. Die Arretierung des Zellzyklus einerseits und die erhöhte Menge an CSN-Komplex, welcher in viele regulatorische Prozesse eingreift, sind für die Zellen toxisch.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem CSN, der Stabilität von EB1 und der Dynamik von Mikrotubulifilamenten. Vermutlich ist das CSN/UPS an der Regulation der Mikrotubulipolymerisierung beteiligt und somit in zellulären Funktionen wie der Zellteilung oder dem intrazellulären Transport involviert. Die genauen Mechanismen und Zusammenhänge bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

#### 4.4. Ausblick

Der Abbauweg von EB1 konnte in dieser Arbeit noch nicht vollständig definiert werden. Es konnten Bestandteile einer Ub-Ligase in Pulldowns von EB1 nachgewiesen werden. Die genaue Zusammensetzung dieser Ub-Ligase wurde jedoch nicht ermittelt. Hierzu müssten weitere Analysen von EB1-Pulldowns aus Zelllysaten durchgeführt werden. Der Substratadaptor könnte durch massenspektrometrische Analysen der assoziierten Proteine identifiziert werden. Dadurch wäre eine Rekonstitution der Ub-Ligase mit rekombinanten Proteinen *in vitro* möglich. Untersuchungen zur Aktivierung oder Assemblierung der Ub-Ligase für EB1 könnten weitere Rückschlüsse auf die Regulation des Abbaus von EB1 liefern. Durch die Kenntnis der Ub-Ligase von EB1 könnte ebenfalls der Ort der Ubiquitinierung von EB1 in der Zelle bestimmt werden.

Eine Stabilisierung von Id1 und Id3 durch das CSN konnte auch ohne eine direkte Phosphorylierung durch CSN-assoziierte Kinasen gezeigt werden (Berse et al., 2004). Die Effekte der Bindung und der Phosphorylierung von EB1 durch das CSN müssen getrennt voneinander untersucht werden. Im Falle von EB1 wäre die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen notwendig, um den Effekt der Bindung an das CSN an sich auf die Stabilität von EB1 zu untersuchen. Eine entsprechende Mutante von EB1, die nicht mehr durch die CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert wird, das CSN aber noch bindet, könnte für derartige Experimente verwendet werden. Der Abbau dieser Mutante von EB1 müsste dann in einem Zellkulturmodell analysiert werden. Da Curcumin sämtliche Phosphorylierungen durch die CSN-assoziierten Kinasen inhibiert, ist es denkbar, dass neben der Phosphorylierung von EB1 noch weitere Phosphorylierungen von anderen Proteinen einen Einfluss auf den Abbau von EB1 haben. Mögliche Phosphorylierungen der Ub-Ligase von EB1 durch die CSN-assoziierten Kinasen müssen in diesem Zusammenhang ebenfalls studiert werden.

Die Verteilung des CSN in der Zelle war bisher nicht genauer charakterisiert. Dazu sollten die siRNA-Knockdown Zellen weiter untersucht werden, ob es in diesen Unterschiede zu den Kontrollzellen in der Verteilung des CSN gibt. Dabei wäre besonders der Vergleich zwischen siCSN1- bzw. siCSN3- und siCSN5-Zellen interessant. Während des Zellzyklus schien es nach dem Abbau der Kernmembran zu einer gleichmäßigen Verteilung des CSN in den Zellen zu kommen. Der Import

oder Export des CSN in bzw. aus dem Zellkern könnte durch die Behandlung mit entsprechenden Inhibitoren weiter untersucht werden.

Der Effekt des CSN auf die Mikrotubulifilamente muss noch weiter erforscht werden. In *in vitro*-Polymerisationsstudien von Mikrotubulifilamenten könnte ein direkter Effekt des CSN auf die Polymerisierung studiert werden. Hierbei sollten Mutanten von EB1 eingesetzt werden, die nicht mehr von den CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert werden oder phosphomimetische Mutationen tragen. Dadurch könnte ein Effekt der Phosphorylierung auf die Stabilität und die Aktivität von EB1 untersucht werden.

Das Centrosom dient zur Beladung von neu ausgebildeten Mikrotubulifilamenten mit EB1 (Louie et al., 2004; Musa et al., 2003; Rehberg und Graf, 2002). Durch die fehlende Stabilisierung von EB1 im Centrosom nach dem Knockdown von CSN-Untereinheiten ist eine verminderte Dynamik bei der Ausbildung von Mikrotubulifilamenten zu erwarten. Dies könnte in Experimenten zur Reorganisation der Mikrotubuli nach Nocodazolbehandlung von CSN-siRNA-Zelllinien untersucht werden.

Die Regulation der Mikrotubulifilamente ist von klinischem Interesse, da die Inhibition der Mikrotubulipolymerisierung zur Apoptose führt. Des Weiteren ist das Cytoskelett an der Zellmigration beteiligt, was von großer Bedeutung für die Tumorangio-genese ist. Die genauen Kenntnisse, wie das CSN zur Regulation der Mikrotubuli beiträgt, könnte zur Entwicklung von neuen Ansätzen in der Tumorthherapie beitragen.

**Literaturverzeichnis**

- Ardley, H. C.; Scott, G. B.; Rose, S. A.; Tan, N. G.; Markham, A. F. und Robinson, P. A. (2003): Inhibition of proteasomal activity causes inclusion formation in neuronal and non-neuronal cells overexpressing Parkin, *Mol Biol Cell* 14 [11], Seite 4541-56.
- Arnal, I.; Karsenti, E. und Hyman, A. A. (2000): Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts, *J Cell Biol* 149 [4], Seite 767-74.
- Asakawa, K. und Toda, T. (2006): Cooperation of EB1-Mal3 and the Bub1 spindle checkpoint, *Cell Cycle* 5 [1], Seite 27-30.
- Asakawa, K.; Toya, M.; Sato, M.; Kanai, M.; Kume, K.; Goshima, T.; Garcia, M. A.; Hirata, D. und Toda, T. (2005): Mal3, the fission yeast EB1 homologue, cooperates with Bub1 spindle checkpoint to prevent monopolar attachment, *EMBO Rep* 6 [12], Seite 1194-200.
- Askham, J. M.; Vaughan, K. T.; Goodson, H. V. und Morrison, E. E. (2002): Evidence that an interaction between EB1 and p150<sup>Glued</sup> is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome, *Mol Biol Cell* 13 [10], Seite 3627-45.
- Bech-Otschir, D.; Kapelari, B. und Dubiel, W. (2005): The COP9 Signalosome: Its Possible Role in the Ubiquitin System 1, Mayer, R.J.; Ciechanover, A.J und Rechsteiner, M., *Ubiquitin and the Chemistry of Life* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bech-Otschir, D.; Kraft, R.; Huang, X.; Henklein, P.; Kapelari, B.; Pollmann, C. und Dubiel, W. (2001): COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system 20, *Embo J*.
- Beinhauer, J. D.; Hagan, I. M.; Hegemann, J. H. und Fleig, U. (1997): Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form, *J Cell Biol* 139 [3], Seite 717-28.
- Berse, M.; Bounpheng, M.; Huang, X.; Christy, B.; Pollmann, C. und Dubiel, W. (2004): Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome, *J Mol Biol* 343 [2], Seite 361-70.
- Bienz, M. (2002): The subcellular destinations of APC proteins, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 [5], Seite 328-38.
- Bjorklund, M.; Taipale, M.; Varjosalo, M.; Saharinen, J.; Lahdenpera, J. und Taipale, J. (2006): Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi, *Nature* 439 [7079], Seite 1009-13.
- Bornens, M. (2002): Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms, *Curr Opin Cell Biol* 14 [1], Seite 25-34.
- Bornstein, G.; Ganoth, D. und Herskho, A. (2006): Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCF<sup>Skp2</sup> ubiquitin ligase by F-box protein and substrate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [31], Seite 11515-20.
- Bounpheng, M. A.; Melnikova, I. N.; Dodds, S. G.; Chen, H.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A. und Christy, B. A. (2000): Characterization of the mouse JAB1 cDNA and protein, *Gene* 242 [1-2], Seite 41-50.
- Bramham, J.; Hodgkinson, J. L.; Smith, B. O.; Uhrin, D.; Barlow, P. N. und Winder, S. J. (2002): Solution structure of the calponin CH domain and fitting to the 3D-helical reconstruction of F-actin:calponin, *Structure* 10 [2], Seite 249-58.

- Braun, B. C.; Glickman, M.; Kraft, R.; Dahlmann, B.; Kloetzel, P. M.; Finley, D. und Schmidt, M. (1999): The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity, *Nat Cell Biol* 1 [4], Seite 221-6.
- Brummelkamp, T. R.; Bernards, R. und Agami, R. (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science* 296 [5567], Seite 550-3.
- Bu, W. und Su, L. K. (2001): Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins, *Oncogene* 20 [25], Seite 3185-92.
- Busch, K. E. und Brunner, D. (2004): The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules, *Curr Biol* 14 [7], Seite 548-59.
- Busch, S.; Eckert, S. E.; Krappmann, S. und Braus, G. H. (2003): The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, *Mol Microbiol* 49 [3], Seite 717-30.
- Cagney, G.; Uetz, P. und Fields, S. (2001): Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome, *Physiol Genomics* 7 [1], Seite 27-34.
- Chamovitz, D. A.; Wei, N.; Osterlund, M. T.; von Arnim, A. G.; Staub, J. M.; Matsui, M. und Deng, X. W. (1996): The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch, *Cell* 86 [1], Seite 115-21.
- Chen, C. R.; Chen, J. und Chang, E. C. (2000): A conserved interaction between Moe1 and Mal3 is important for proper spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol Biol Cell* 11 [12], Seite 4067-77.
- Chen, L. und Madura, K. (2002): Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome, *Mol Cell Biol* 22 [13], Seite 4902-13.
- Chretien, D.; Kenney, J. M.; Fuller, S. D. und Wade, R. H. (1996): Determination of microtubule polarity by cryo-electron microscopy, *Structure* 4 [9], Seite 1031-40.
- Chretien, D.; Metoz, F.; Verde, F.; Karsenti, E. und Wade, R. H. (1992): Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules, *J Cell Biol* 117 [5], Seite 1031-40.
- Ciechanover, A. und Ben-Saadon, R. (2004): N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in, *Trends Cell Biol* 14 [3], Seite 103-6.
- Cope, G. A. und Deshaies, R. J. (2003): COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases, *Cell* 114 [6], Seite 663-71.
- Cope, G. A. und Deshaies, R. J. (2006): Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels, *BMC Biochem* 7, Seite 1.
- Cope, G. A.; Suh, G. S.; Aravind, L.; Schwarz, S. E.; Zipursky, S. L.; Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. (2002): Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1, *Science* 298 [5593], Seite 608-11.
- Deng, X. W.; Dubiel, W.; Wei, N.; Hofmann, K. und Mundt, K. (2000): Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development, *Trends Genet* 16 [7], Seite 289.
- Denti, S.; Fernandez-Sanchez, M. E.; Rogge, L. und Bianchi, E. (2006): The COP9 signalosome regulates Skp2 levels and proliferation of human cells, *J Biol Chem* 281 [43], Seite 32188-96.
- Desai, A. und Mitchison, T. J. (1997): Microtubule polymerization dynamics, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, Seite 83-117.

- Dias, D. C.; Dolios, G.; Wang, R. und Pan, Z. Q. (2002): CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1.Fbx29 to form an SCF-like complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [26], Seite 16601-6.
- Dohmann, E. M.; Kuhnle, C. und Schwechheimer, C. (2005): Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17 [7], Seite 1967-78.
- Draviam, V. M.; Shapiro, I.; Aldridge, B. und Sorger, P. K. (2006): Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells, *Embo J* 25 [12], Seite 2814-27.
- Elsasser, S.; Chandler-Militello, D.; Muller, B.; Hanna, J. und Finley, D. (2004): Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome, *J Biol Chem* 279 [26], Seite 26817-22.
- Fabunmi, R. P.; Wigley, W. C.; Thomas, P. J. und DeMartino, G. N. (2000): Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome, *J Biol Chem* 275 [1], Seite 409-13.
- Fehlker, M.; Wendler, P.; Lehmann, A. und Enenkel, C. (2003): Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly, *EMBO Rep* 4 [10], Seite 959-63.
- Fratta, P.; Engel, W. K.; McFerrin, J.; Davies, K. J.; Lin, S. W. und Askanas, V. (2005): Proteasome inhibition and aggresome formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers, *Am J Pathol* 167 [2], Seite 517-26.
- Freed, E.; Lacey, K. R.; Huie, P.; Lyapina, S. A.; Deshaies, R. J.; Stearns, T. und Jackson, P. K. (1999): Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle, *Genes Dev* 13 [17], Seite 2242-57.
- Freilich, S.; Oron, E.; Kapp, Y.; Nevo-Caspi, Y.; Orgad, S.; Segal, D. und Chamovitz, D. A. (1999): The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*, *Curr Biol* 9 [20], Seite 1187-90.
- Fu, H.; Reis, N.; Lee, Y.; Glickman, M. H. und Vierstra, R. D. (2001): Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome, *Embo J* 20 [24], Seite 7096-107.
- Fullbeck, M.; Huang, X.; Dumdey, R.; Frommel, C.; Dubiel, W. und Preissner, R. (2005): Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells, *BMC Cancer* 5, Seite 97.
- Galjart, N. (2005): CLIPs and CLASPs and cellular dynamics, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 [6], Seite 487-98.
- Garcia-Mata, R.; Bebok, Z.; Sorscher, E. J. und Sztul, E. S. (1999): Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera, *J Cell Biol* 146 [6], Seite 1239-54.
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Baumeister, W.; Fried, V. A. und Finley, D. (1998): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* 94 [5], Seite 615-23.
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Fried, V. A. und Finley, D. (1998): The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome, *Mol Cell Biol* 18 [6], Seite 3149-62.
- Goldenberg, S. J.; Cascio, T. C.; Shumway, S. D.; Garbutt, K. C.; Liu, J.; Xiong, Y. und Zheng, N. (2004): Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals



- regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases, *Cell* 119 [4], Seite 517-28.
- Goldsmith, S. C.; Pokala, N.; Shen, W.; Fedorov, A. A.; Matsudaira, P. und Almo, S. C. (1997): The structure of an actin-crosslinking domain from human fimbrin, *Nat Struct Biol* 4 [9], Seite 708-12.
- Gordon, C. (2002): The intracellular localization of the proteasome, *Curr Top Microbiol Immunol* 268, Seite 175-84.
- Groisman, R.; Polanowska, J.; Kuraoka, I.; Sawada, J.; Saijo, M.; Drapkin, R.; Kisselev, A. F.; Tanaka, K. und Nakatani, Y. (2003): The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, *Cell* 113 [3], Seite 357-67.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 [6624], Seite 463-71.
- Grover, S. und Hamel, E. (1994): The magnesium-GTP interaction in microtubule assembly, *Eur J Biochem* 222 [1], Seite 163-72.
- Gupta, K. K.; Bharné, S. S.; Rathinasamy, K.; Naik, N. R. und Panda, D. (2006): Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding, *Febs J* 273 [23], Seite 5320-32.
- Gusmaroli, G.; Feng, S. und Deng, X. W. (2004): The *Arabidopsis* CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development, *Plant Cell* 16 [11], Seite 2984-3001.
- Gusmaroli, G.; Figueroa, P.; Serino, G. und Deng, X. W. (2007): Role of the MPN Subunits in COP9 Signalosome Assembly and Activity, and Their Regulatory Interaction with *Arabidopsis* Cullin3-Based E3 Ligases, *Plant Cell*.
- Haas, A. L.; Warms, J. V.; Hershko, A. und Rose, I. A. (1982): Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation, *J Biol Chem* 257 [5], Seite 2543-8.
- Hatakeyama, S. und Nakayama, K. I. (2003): U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases, *Biochem Biophys Res Commun* 302 [4], Seite 635-45.
- Hayashi, I. und Ikura, M. (2003): Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1), *J Biol Chem* 278 [38], Seite 36430-4.
- Hayashi, I.; Wilde, A.; Mal, T. K. und Ikura, M. (2005): Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150<sup>Glued</sup> complex, *Mol Cell* 19 [4], Seite 449-60.
- He, Q.; Cheng, P.; He, Q. und Liu, Y. (2005): The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCF<sup>FWD-1</sup> complex, *Genes Dev* 19 [13], Seite 1518-31.
- Henke, W.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Seeger, M.; Schade, R.; Jungblut, P.; Naumann, M. und Dubiel, W. (1999): Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid', *Mol Biol Rep* 26 [1-2], Seite 29-34.
- Hetfeld, B. K.; Helfrich, A.; Kapelari, B.; Scheel, H.; Hofmann, K.; Guterman, A.; Glickman, M.; Schade, R.; Kloetzel, P. M. und Dubiel, W. (2005): The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1, *Curr Biol* 15 [13], Seite 1217-21.
- Hirokawa, N.; Noda, Y. und Okada, Y. (1998): Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division, *Curr Opin Cell Biol* 10 [1], Seite 60-73.

- Hofmann, K. und Bucher, P. (1998): The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes, *Trends Biochem Sci* 23 [6], Seite 204-5.
- Honda, R.; Tanaka, H. und Yasuda, H. (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *FEBS Lett* 420 [1], Seite 25-7.
- Honnappa, S.; John, C. M.; Kostrewa, D.; Winkler, F. K. und Steinmetz, M. O. (2005): Structural insights into the EB1-APC interaction, *Embo J* 24 [2], Seite 261-9.
- Hori, T.; Osaka, F.; Chiba, T.; Miyamoto, C.; Okabayashi, K.; Shimbara, N.; Kato, S. und Tanaka, K. (1999): Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8, *Oncogene* 18 [48], Seite 6829-34.
- Howard, J. und Hyman, A. A. (2003): Dynamics and mechanics of the microtubule plus end, *Nature* 422 [6933], Seite 753-8.
- Huang, X.; Hetfeld, B. K.; Seifert, U.; Kahne, T.; Kloetzel, P. M.; Naumann, M.; Bech-Otschir, D. und Dubiel, W. (2005): Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction, *Febs J* 272 [15], Seite 3909-17.
- Huang, X.; Wagner, E.; Dumdey, R.; Peth, A.; Berse, M.; Dubiel, W. und Berndt, C. (2006): Phosphorylation by COP9 Signalosome-Associated CK2 Promotes Degradation of p27 during the G1 Cell Cycle Phase, *Israel Journal of Chemistry* 46, Seite 231-238.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M. und Howley, P. M. (1993): Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins, *Mol Cell Biol* 13 [8], Seite 4918-27.
- Jiang, J.; Ballinger, C. A.; Wu, Y.; Dai, Q.; Cyr, D. M.; Hohfeld, J. und Patterson, C. (2001): CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation, *J Biol Chem* 276 [46], Seite 42938-44.
- Johnston, J. A.; Illing, M. E. und Kopito, R. R. (2002): Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes, *Cell Motil Cytoskeleton* 53 [1], Seite 26-38.
- Kampinga, H. H.; Kanon, B.; Salomons, F. A.; Kabakov, A. E. und Patterson, C. (2003): Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 23 [14], Seite 4948-58.
- Kamura, T.; Maenaka, K.; Kotoshiba, S.; Matsumoto, M.; Kohda, D.; Conaway, R. C.; Conaway, J. W. und Nakayama, K. I. (2004): VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases, *Genes Dev* 18 [24], Seite 3055-65.
- Kapelari, B.; Bech-Otschir, D.; Hegerl, R.; Schade, R.; Dumdey, R. und Dubiel, W. (2000): Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome, *J Mol Biol* 300 [5], Seite 1169-78.
- Kikkawa, M. und Metlagel, Z. (2006): A molecular "zipper" for microtubules, *Cell* 127 [7], Seite 1302-4.
- Kita, K.; Wittmann, T.; Nathke, I. S. und Waterman-Storer, C. M. (2006): Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1, *Mol Biol Cell* 17 [5], Seite 2331-45.
- Kline-Smith, S. L. und Walczak, C. E. (2004): Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics, *Mol Cell* 15 [3], Seite 317-27.
- Knowlton, J. R.; Johnston, S. C.; Whitby, F. G.; Realini, C.; Zhang, Z.; Rechsteiner, M. und Hill, C. P. (1997): Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha), *Nature* 390 [6660], Seite 639-43.

- Komarova, Y. A.; Akhmanova, A. S.; Kojima, S.; Galjart, N. und Borisy, G. G. (2002): Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo, *J Cell Biol* 159 [4], Seite 589-99.
- Kurz, T.; Pintard, L.; Willis, J. H.; Hamill, D. R.; Gonczy, P.; Peter, M. und Bowerman, B. (2002): Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway, *Science* 295 [5558], Seite 1294-8.
- Kwak, H. J.; Kim, S. H.; Yoo, H. G.; Park, S. H. und Lee, C. H. (2005): Jun activation domain-binding protein 1 is required for mitotic checkpoint activation via its involvement in hyperphosphorylation of 53BP1, *J Cancer Res Clin Oncol* 131 [12], Seite 789-96.
- Kwok, S. F.; Solano, R.; Tsuge, T.; Chamovitz, D. A.; Ecker, J. R.; Matsui, M. und Deng, X. W. (1998): *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations, *Plant Cell* 10 [11], Seite 1779-90.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-5.
- Lam, Y. A.; Lawson, T. G.; Velayutham, M.; Zweier, J. L. und Pickart, C. M. (2002): A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal, *Nature* 416 [6882], Seite 763-7.
- Lee, D. H. und Goldberg, A. L. (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists, *Trends Cell Biol* 8 [10], Seite 397-403.
- Li, L. und Deng, X. W. (2003): The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome?, *Trends Cell Biol* 13 [10], Seite 507-9.
- Li, W.; Tu, D.; Brunger, A. T. und Ye, Y. (2007): A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate, *Nature* 446 [7133], Seite 333-7.
- Liakopoulos, D.; Busgen, T.; Brychzy, A.; Jentsch, S. und Pause, A. (1999): Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [10], Seite 5510-5.
- Ligon, L. A.; Shelly, S. S.; Tokito, M. und Holzbaur, E. L. (2003): The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization, *Mol Biol Cell* 14 [4], Seite 1405-17.
- Lim, A. C.; Tiu, S. Y.; Li, Q. und Qi, R. Z. (2004): Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2, *J Biol Chem* 279 [6], Seite 4433-9.
- Lima, J. F.; Malavazi, I.; von Zeska Kress Fagundes, M. R.; Savoldi, M.; Goldman, M. H.; Schwier, E.; Braus, G. H. und Goldman, G. H. (2005): The csuD/csnE signalosome genes are involved in the *Aspergillus nidulans* DNA damage response, *Genetics* 171 [3], Seite 1003-15.
- Liu, C.; Powell, K. A.; Mundt, K.; Wu, L.; Carr, A. M. und Caspari, T. (2003): Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms, *Genes Dev* 17 [9], Seite 1130-40.
- Liu, Y.; Schiff, M.; Serino, G.; Deng, X. W. und Dinesh-Kumar, S. P. (2002): Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus, *Plant Cell* 14 [7], Seite 1483-96.
- Louie, R. K.; Bahmanyar, S.; Siemers, K. A.; Votin, V.; Chang, P.; Stearns, T.; Nelson, W. J. und Barth, A. I. (2004): Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes, *J Cell Sci* 117 [Pt 7], Seite 1117-28.

- Lupas, A.; Koster, A. J. und Baumeister, W. (1993): Structural features of 26S and 20S proteasomes, *Enzyme Protein* 47 [4-6], Seite 252-73.
- Lyapina, S.; Cope, G.; Shevchenko, A.; Serino, G.; Tsuge, T.; Zhou, C.; Wolf, D. A.; Wei, N.; Shevchenko, A. und Deshaies, R. J. (2001): Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome, *Science* 292 [5520], Seite 1382-5.
- Lykke-Andersen, K.; Schaefer, L.; Menon, S.; Deng, X. W.; Miller, J. B. und Wei, N. (2003): Disruption of the COP9 signalosome Csn2 subunit in mice causes deficient cell proliferation, accumulation of p53 and cyclin E, and early embryonic death, *Mol Cell Biol* 23 [19], Seite 6790-7.
- Mallik, R. und Gross, S. P. (2004): Molecular motors: strategies to get along, *Curr Biol* 14 [22], Seite R971-82.
- Mandelkow, E. M.; Schultheiss, R.; Rapp, R.; Muller, M. und Mandelkow, E. (1986): On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness, *J Cell Biol* 102 [3], Seite 1067-73.
- Maytal-Kivity, V.; Piran, R.; Pick, E.; Hofmann, K. und Glickman, M. H. (2002): COP9 signalosome components play a role in the mating pheromone response of *S. cerevisiae*, *EMBO Rep* 3 [12], Seite 1215-21.
- Maytal-Kivity, V.; Reis, N.; Hofmann, K. und Glickman, M. H. (2002): MPN<sup>+</sup>, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function, *BMC Biochem* 3 [1], Seite 28.
- Mimori-Kiyosue, Y.; Shiina, N. und Tsukita, S. (2000): The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules, *Curr Biol* 10 [14], Seite 865-8.
- Morrison, E. E.; Wardleworth, B. N.; Askham, J. M.; Markham, A. F. und Meredith, D. M. (1998): EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle, *Oncogene* 17 [26], Seite 3471-7.
- Mundt, K. E.; Porte, J.; Murray, J. M.; Brikos, C.; Christensen, P. U.; Caspari, T.; Hagan, I. M.; Millar, J. B.; Simanis, V.; Hofmann, K. und Carr, A. M. (1999): The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase, *Curr Biol* 9 [23], Seite 1427-30.
- Musa, H.; Orton, C.; Morrison, E. E. und Peckham, M. (2003): Microtubule assembly in cultured myoblasts and myotubes following nocodazole induced microtubule depolymerisation, *J Muscle Res Cell Motil* 24 [4-6], Seite 301-8.
- Nateri, A. S.; Riera-Sans, L.; Da Costa, C. und Behrens, A. (2004): The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling, *Science* 303 [5662], Seite 1374-8.
- Naumann, M.; Bech-Otschir, D.; Huang, X.; Ferrell, K. und Dubiel, W. (1999): COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK, *J Biol Chem* 274 [50], Seite 35297-300.
- Nogales, E.; Wolf, S. G. und Downing, K. H. (1998): Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography, *Nature* 391 [6663], Seite 199-203.
- Orlowski, M. (1993): The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle, *J Lab Clin Med* 121 [2], Seite 187-9.
- Oron, E.; Mannervik, M.; Rencus, S.; Harari-Steinberg, O.; Neuman-Silberberg, S.; Segal, D. und Chamovitz, D. A. (2002): COP9 signalosome subunits 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*, *Development* 129 [19], Seite 4399-409.

- Osaka, F.; Kawasaki, H.; Aida, N.; Saeki, M.; Chiba, T.; Kawashima, S.; Tanaka, K. und Kato, S. (1998): A new NEDD8-ligating system for cullin-4A, *Genes Dev* 12 [15], Seite 2263-8.
- Peng, Z.; Serino, G. und Deng, X. W. (2001): Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 13 [11], Seite 2393-407.
- Peng, Z.; Shen, Y.; Feng, S.; Wang, X.; Chitteti, B. N.; Vierstra, R. D. und Deng, X. W. (2003): Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo, *Curr Biol* 13 [13], Seite R504-5.
- Peters, J. M.; Cejka, Z.; Harris, J. R.; Kleinschmidt, J. A. und Baumeister, W. (1993): Structural features of the 26 S proteasome complex, *J Mol Biol* 234 [4], Seite 932-7.
- Petroski, M. D. und Deshaies, R. J. (2005): Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34, *Cell* 123 [6], Seite 1107-20.
- Pickart, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* 70, Seite 503-33.
- Pintard, L.; Kurz, T.; Glaser, S.; Willis, J. H.; Peter, M. und Bowerman, B. (2003): Neddylation and deneddylation of CUL-3 is required to target MEL-1/Katanin for degradation at the meiosis-to-mitosis transition in *C. elegans*, *Curr Biol* 13 [11], Seite 911-21.
- Pintard, L.; Willis, J. H.; Willems, A.; Johnson, J. L.; Srayko, M.; Kurz, T.; Glaser, S.; Mains, P. E.; Tyers, M.; Bowerman, B. und Peter, M. (2003): The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase, *Nature* 425 [6955], Seite 311-6.
- Read, M. A.; Brownell, J. E.; Gladysheva, T. B.; Hottelet, M.; Parent, L. A.; Coggins, M. B.; Pierce, J. W.; Podust, V. N.; Luo, R. S.; Chau, V. und Palombella, V. J. (2000): Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(betaTrCP)-dependent ubiquitination of I $\kappa$ B, *Mol Cell Biol* 20 [7], Seite 2326-33.
- Rehberg, M. und Graf, R. (2002): *Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation, *Mol Biol Cell* 13 [7], Seite 2301-10.
- Reilein, A. und Nelson, W. J. (2005): APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks, *Nat Cell Biol* 7 [5], Seite 463-73.
- Rogers, S. L.; Rogers, G. C.; Sharp, D. J. und Vale, R. D. (2002): *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle, *J Cell Biol* 158 [5], Seite 873-84.
- Sammak, P. J. und Borisy, G. G. (1988): Direct observation of microtubule dynamics in living cells, *Nature* 332 [6166], Seite 724-6.
- Sandblad, L.; Busch, K. E.; Tittmann, P.; Gross, H.; Brunner, D. und Hoenger, A. (2006): The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam, *Cell* 127 [7], Seite 1415-24.
- Scheffner, M.; Huibregtse, J. M.; Vierstra, R. D. und Howley, P. M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell* 75 [3], Seite 495-505.
- Schulze, A.; Standera, S.; Buerger, E.; Kikkert, M.; van Voorden, S.; Wiertz, E.; Koning, F.; Kloetzel, P. M. und Seeger, M. (2005): The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway, *J Mol Biol* 354 [5], Seite 1021-7.

- Schwechheimer, C.; Serino, G.; Callis, J.; Crosby, W. L.; Lyapina, S.; Deshaies, R. J.; Gray, W. M.; Estelle, M. und Deng, X. W. (2001): Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF<sup>TIR1</sup> in mediating auxin response, *Science* 292 [5520], Seite 1379-82.
- Seeger, M.; Kraft, R.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Dumdey, R.; Schade, R.; Gordon, C.; Naumann, M. und Dubiel, W. (1998): A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits, *Faseb J* 12 [6], Seite 469-78.
- Seemuller, E.; Lupas, A. und Baumeister, W. (1996): Autocatalytic processing of the 20S proteasome, *Nature* 382 [6590], Seite 468-71.
- Sherwood, S. W.; Sheridan, J. P. und Schimke, R. T. (1994): Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid: relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in HeLa S3 cells, *Exp Cell Res* 215 [2], Seite 373-9.
- Si, X.; Wang, Y.; Wong, J.; Zhang, J.; McManus, B. M. und Luo, H. (2007): Dysregulation of the Ubiquitin-Proteasome System by Curcumin Suppresses Cocksackievirus B3 Replication, *J Virol*.
- Slep, K. C.; Rogers, S. L.; Elliott, S. L.; Ohkura, H.; Kolodziej, P. A. und Vale, R. D. (2005): Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end, *J Cell Biol* 168 [4], Seite 587-98.
- Sosa, H. und Milligan, R. A. (1996): Three-dimensional structure of ncd-decorated microtubules obtained by a back-projection method, *J Mol Biol* 260 [5], Seite 743-55.
- Strickland, L. I.; Wen, Y.; Gundersen, G. G. und Burgess, D. R. (2005): Interaction between EB1 and p150<sup>Glued</sup> is required for anaphase astral microtubule elongation and stimulation of cytokinesis, *Curr Biol* 15 [24], Seite 2249-55.
- Su, L. K.; Burrell, M.; Hill, D. E.; Gyuris, J.; Brent, R.; Wiltshire, R.; Trent, J.; Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1995): APC binds to the novel protein EB1, *Cancer Res* 55 [14], Seite 2972-7.
- Sufan, R. I. und Ohh, M. (2006): Role of the NEDD8 modification of Cul2 in the sequential activation of ECV complex, *Neoplasia* 8 [11], Seite 956-63.
- Sullivan, J. A.; Shirasu, K. und Deng, X. W. (2003): The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants, *Nat Rev Genet* 4 [12], Seite 948-58.
- Tassin, A. M. und Bornens, M. (1999): Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells, *Biol Cell* 91 [4-5], Seite 343-54.
- Tirnauer, J. S.; O'Toole, E.; Berrueta, L.; Bierer, B. E. und Pellman, D. (1999): Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules, *J Cell Biol* 145 [5], Seite 993-1007.
- Tomoda, K.; Kato, J. Y.; Tatsumi, E.; Takahashi, T.; Matsuo, Y. und Yoneda-Kato, N. (2005): The Jab1/COP9 signalosome subcomplex is a downstream mediator of Bcr-Abl kinase activity and facilitates cell-cycle progression, *Blood* 105 [2], Seite 775-83.
- Tomoda, K.; Kubota, Y. und Kato, J. (1999): Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1, *Nature* 398 [6723], Seite 160-5.
- Tong, A. H.; Lesage, G.; Bader, G. D.; Ding, H.; Xu, H.; Xin, X.; Young, J.; Berriz, G. F.; Brost, R. L.; Chang, M.; Chen, Y.; Cheng, X.; Chua, G.; Friesen, H.; Goldberg, D. S.; Haynes, J.; Humphries, C.; He, G.; Hussein, S.; Ke, L.; Krogan, N.; Li, Z.; Levinson, J. N.; Lu, H.; Menard, P.; Munyana, C.; Parsons, A. B.; Ryan, O.; Tonikian, R.; Roberts, T.; Sdicu, A. M.; Shapiro, J.; Sheikh, B.; Suter, B.; Wong, S. L.; Zhang, L. V.; Zhu, H.; Burd, C. G.; Munro, S.; Sander, C.; Rine, J.; Greenblatt, J.; Peter, M.; Bretscher, A.; Bell, G.; Roth, F. P.;

- Brown, G. W.; Andrews, B.; Bussey, H. und Boone, C. (2004): Global mapping of the yeast genetic interaction network, *Science* 303 [5659], Seite 808-13.
- Tsuge, T.; Matsui, M. und Wei, N. (2001): The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain, *J Mol Biol* 305 [1], Seite 1-9.
- Tyers, M. und Jorgensen, P. (2000): Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy, *Curr Opin Genet Dev* 10 [1], Seite 54-64.
- Uhle, S.; Medalia, O.; Waldron, R.; Dumdey, R.; Henklein, P.; Bech-Otschir, D.; Huang, X.; Berse, M.; Sperling, J.; Schade, R. und Dubiel, W. (2003): Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome, *Embo J* 22 [6], Seite 1302-12.
- Ullah, Z.; Buckley, M.; Arnosti, D. N. und Henry, R. W. (2007): Retinoblastoma Protein Regulation by the COP9 Signalosome, *Mol Biol Cell*.
- Ustrell, V.; Hoffman, L.; Pratt, G. und Rechsteiner, M. (2002): PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair, *Embo J* 21 [13], Seite 3516-25.
- Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W. H.; Yates, J. R., 3rd; Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. (2002): Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome, *Science* 298 [5593], Seite 611-5.
- Weber, K.; Rathke, P. C. und Osborn, M. (1978): Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 [4], Seite 1820-4.
- Wee, S.; Geyer, R. K.; Toda, T. und Wolf, D. A. (2005): CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability, *Nat Cell Biol* 7 [4], Seite 387-91.
- Wei, N.; Chamovitz, D. A. und Deng, X. W. (1994): *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development, *Cell* 78 [1], Seite 117-24.
- Wei, N. und Deng, X. W. (1992): COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *arabidopsis*, *Plant Cell* 4 [12], Seite 1507-18.
- Wei, N. und Deng, X. W. (1998): Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants, *Photochem Photobiol* 68 [2], Seite 237-41.
- Wei, N. und Deng, X. W. (2003): The COP9 signalosome, *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, Seite 261-86.
- Wei, N.; Tsuge, T.; Serino, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; Matsui, M. und Deng, X. W. (1998): The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex, *Curr Biol* 8 [16], Seite 919-22.
- Wei, R. R.; Al-Bassam, J. und Harrison, S. C. (2007): The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment, *Nat Struct Mol Biol* 14 [1], Seite 54-9.
- Wertz, I. E.; O'Rourke, K. M.; Zhang, Z.; Dornan, D.; Arnott, D.; Deshaies, R. J. und Dixit, V. M. (2004): Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase, *Science* 303 [5662], Seite 1371-4.
- Wigley, W. C.; Fabunmi, R. P.; Lee, M. G.; Marino, C. R.; Muallem, S.; DeMartino, G. N. und Thomas, P. J. (1999): Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome, *J Cell Biol* 145 [3], Seite 481-90.

- Wilson, M. P.; Sun, Y.; Cao, L. und Majerus, P. W. (2001): Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2, *J Biol Chem* 276 [44], Seite 40998-1004.
- Wissel, H.; Muller, T.; Rudiger, M.; Krull, M. und Wauer, R. R. (2005): Contact of *Chlamydomophila pneumoniae* with type II cell triggers activation of calcium-mediated NF-kappa B pathway, *Biochim Biophys Acta* 1743 [1-2], Seite 37-48.
- Wolf, D. A.; Zhou, C. und Wee, S. (2003): The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?, *Nat Cell Biol* 5 [12], Seite 1029-33.
- Woods, C. M.; Zhu, J.; McQueney, P. A.; Bollag, D. und Lazarides, E. (1995): Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway, *Mol Med* 1 [5], Seite 506-26.
- Wu, J. T.; Lin, H. C.; Hu, Y. C. und Chien, C. T. (2005): Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation, *Nat Cell Biol* 7 [10], Seite 1014-20.
- Wu, K.; Yamoah, K.; Dolios, G.; Gan-Erdene, T.; Tan, P.; Chen, A.; Lee, C. G.; Wei, N.; Wilkinson, K. D.; Wang, R. und Pan, Z. Q. (2003): DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1, *J Biol Chem* 278 [31], Seite 28882-91.
- Yao, T. und Cohen, R. E. (2002): A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome, *Nature* 419 [6905], Seite 403-7.
- Yoneda-Kato, N.; Tomoda, K.; Umehara, M.; Arata, Y. und Kato, J. Y. (2005): Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3, *Embo J* 24 [9], Seite 1739-49.
- Zheng, N.; Schulman, B. A.; Song, L.; Miller, J. J.; Jeffrey, P. D.; Wang, P.; Chu, C.; Koepp, D. M.; Elledge, S. J.; Pagano, M.; Conaway, R. C.; Conaway, J. W.; Harper, J. W. und Pavletich, N. P. (2002): Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex, *Nature* 416 [6882], Seite 703-9.
- Zhou, C.; Wee, S.; Rhee, E.; Naumann, M.; Dubiel, W. und Wolf, D. A. (2003): Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p, *Mol Cell* 11 [4], Seite 927-38.
- Zhou, P. und Howley, P. M. (1998): Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases, *Mol Cell* 2 [5], Seite 571-80.



## 5. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Activator protein-1
APS	Ammonuimperoxodisulfat
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
CAND1	Cullin associated, Nedd8 dissociated
CH	Calponin Homologie
CHIP	carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein
CHX	Cycloheximid
cDNA	complementary DNA
CK2	Casein Kinase 2
CLIP	Cytoplasmatic linker protein
COP	constitutive photomorphogenic
CRL	Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen
CSN	COP9-Signalosom
Cul	Cullin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethanol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
EB1	microtubule-end-binding
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	reduced glutathione
GTP	Guanosintriphosphat
HECT	homologous to E6-AP C-terminus
His	Histidin
IF	Immunofluoreszenz
IP	Immunopräzipitation
IP3-5,6 Kinase	Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase
JAMM	Jab1/MPN domain metalloprotease
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
min	Minuten
MPN	Mpr1, Pad1 N-terminal
mRNA	Messenger RNA
MTOC	microtubule organizing centre
NEB	Nuclear envelope breakdown
Nedd8	neuronally expressed developmentally downregulated 8

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Proteasome, COP9 signalosome, Initiation factor 3
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PKD	Protein Kinase D
Rbx	RING-Box Protein
RING	really interesting new gene
RNA	ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	Short interference RNA
TAE	Tris acetate EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin Proteasom System
USP15	Ubiquitin specific protease 15
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

**Publikationsliste**

- Grosch, R.; Schneider, J. H.; Peth, A.; Waschke, A.; Franken, P.; Kofoet, A. und Jabaji-Hare, S. H. (2007): Development of a specific PCR assay for the detection of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB using SCAR primers, J Appl Microbiol 102 [3], Seite 806-19.
- Huang, X.; Wagner, E.; Dumdey, R.; Peth, A.; Berse, M.; Dubiel, W. und Berndt, C. (2006): Phosphorylation by COP9 Signalosome-Associated CK2 Promotes Degradation of p27 during the G1 Cell Cycle Phase, Israel Journal of Chemistry 46, Seite 231-238.
- Peth, A.; Boettcher, J. P. und Dubiel, W. (2007): Ubiquitin-dependent Proteolysis of the Microtubule End-binding Protein 1, EB1, Is Controlled by the COP9 Signalosome: Possible Consequences for Microtubule Filament Stability, J Mol Biol.
- Peth, A.; Berndt, C.; Henke, W. und Dubiel, W. (2007): Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects complex-mediated phosphorylation, CBD Ubiquitin. eingereicht

**Vorträge:**

SFB Meeting (Berlin, 2005) Characterization of the interaction between the microtubule binding protein EB1 and the COP9 signalosome

Chirurgie Symposium (Berlin, 2005) Die EB1 vermittelte Dynamik des Cytoskelettes wird durch das COP9-Signalosom reguliert

SFB Meeting (Berlin, 2006) Characterization of siRNA mediated knockdowns of COP9 signalosome subunits

**Poster:**

Peth, A. and Dubiel, W. Characterisation of the interaction between the COP9 signalosome and the microtubule binding protein EB1. GBM Annual Fall Meeting, Berlin, 2005

Peth, A. and Dubiel, W. The COP9 Signalosome controls microtubule dynamics by regulating EB1 stability. Zomes IV, New Haven, 2006

Peth, A. and Dubiel, W. The COP9 Signalosome controls microtubule dynamics by regulating EB1 stability. Workshop Ubiquitin, Chaperones and Cancer, Edinburgh, 2007

**Lebenslauf**

## Persönliche Daten:

Name:

Andreas Peth

Geburtsdatum:

25.06.1978 in Idar-Oberstein

## Schulausbildung

1984-1988

Weinsau Grundschule, Idar-Oberstein

1988-1997

Göttenbach-Gymnasium, Idar-Oberstein

## Zivildienst

1997-1998

Arbeiter-Samariter-Bund, KV Birkenfeld

## Akademischer Werdegang

1998-2003

Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg

11.2002-07.2003

Diplomarbeit in der AG PD Dr. Philipp Franken

Seit 09.2003

Doktorarbeit in der AG Prof. Dr. Wolfgang Dubiel

**Danksagung**

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Wolfgang Dubiel, der mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe gab.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Hermann-Georg Holzhütter für die bereitwillige Übernahme meiner Betreuung als Doktorvater danken.

Bei allen Mitarbeitern im Labor der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die vielfältigen Hilfestellungen während meiner Doktorarbeit bedanken. Hierbei möchte ich besonders Renate Dumdey, Bettina Hetfeld und Xiaohua Huang für die Einarbeitung und in die verwendeten Methoden danken.

Für seine fachliche und persönliche Unterstützung und seiner ständigen Diskussionsbereitschaft möchte ich Christoph Berndt meinen besonderen Dank aussprechen.

Für Ihre Hilfe bei der Erstellung von stabil transfizierten Zelllinien möchte ich Ulrike Seifert danken.

Für die Bereitstellung von diversen Vektoren und Konstrukten danke ich Michael Seeger.

Für die Kooperation im Rahmen der Konfokalen Laserscan Mikroskopie möchte ich Jan Peter Böttcher und Prof. Thomas Meyer vom MPI für Infektionsbiologie danken.

Über das Institut hinaus danke ich meinen Freunden und meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung, die mir zuteil wurde.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, den